

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO - PROFESIONAL DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL



TESIS

**"INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN
Phalaenopsis amabilis (L.) Bl., A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES"**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

DAVID ISAURO DE LA CRUZ CÁCERES

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

TARAPOTO - PERÚ
2011

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO – PROFESIONAL DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL



TESIS

**“INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN
Phalaenopsis amabilis (L.) BL., A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES”**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

DAVID ISAURO DE LA CRUZ CÁCERES

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

TARAPOTO – PERÚ

2011

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN-TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO – PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL

ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

TESIS

**“INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN
Phalaenopsis amabilis (L.) Bl., A PARTIR DE SEGMENTOS FOLIARES”**

PRESENTADO POR EL BACHILER:

DAVID ISAURO DE LA CRUZ CÁCERES

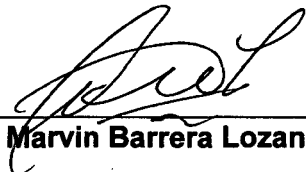
MIEMBROS DEL JURADO



Ing. Elías Torres Flores
Presidente



Ing. M.Sc. Patricia Elena García Gonzáles
Secretario



Ing. Marvin Barrera Lozano
Miembro



Ing. María Emilia Ruíz Sánchez
Asesor

DEDICATORIA

A los maestros de mi vida, mis padres:

*AMÉRICO y REYNA por la confianza,
esfuerzo y sacrificio que hacen día a día
para alcanzar mis metas y ser un
profesional de éxito.*

*A mis hermanos ANÍBAL y HUGO,
por su gran apoyo incondicional y
porque al igual que mis padres son el
motivo que me permite seguir adelante.*

*A mi abuelita JUANA SÁNCHEZ
JAMANCA por la confianza, esfuerzo y
sacrificio que realizó para ser un
profesional de éxito.*

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por regalarme la vida, la salud y una familia maravillosa, gracias por permitir cumplir con este objetivo trazado.

A la Universidad Nacional de San Martín (UNSM), y en especial al Laboratorio de Cultivos y Tejidos Vegetales (LCTV), por brindarme la oportunidad de poder realizar la tesis de pregrado.

A la Ing. María Emilia Ruíz Sánchez; Jefe del Laboratorio de Cultivos y Tejidos Vegetales (LCTV), asesora del presente trabajo de investigación.

Al Ing. Juan Carlos Guerrero Abad, por el asesoramiento de este trabajo de investigación, gracias por compartir sus conocimientos, tiempo, dedicación y su amistad, para poder lograr el cumplimiento de este objetivo.

Al Blgo. Marco Antonio León Martínez, por la propuesta del presente trabajo de investigación.

A los ingenieros Henri Delgado Haya, Wilmar Murrieta Vela por brindarme su amistad, sus consejos para la realización de este trabajo de investigación.

A mis amigos del laboratorio: Mar, Henry, Manuel; a todos ellos gracias, por formar un grupo especial de trabajo, y sobre todo por brindarme su amistad.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	01
II. OBJETIVOS	03
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	04
3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO	04
3.1.1. Origen y distribución.	04
3.1.2. Clasificación botánica	05
3.1.3. Morfología general	06
3.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO	07
3.2.1. Generalidades	07
3.3. MÉTODOS PARA LA MICROPROPAGACIÓN	10
3.3.1. Embriogénesis somática	10
3.3.1.1. Modelos de desarrollo y origen de la embriogénesis somática	12
3.3.1.2. Embriogénesis zigótica y embriogénesis Somática	14
3.3.1.3. Factores que influyen y controlan La embriogénesis somática	16
3.3.1.4. Fases de la embriogénesis somática	17
3.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO	19
3.4.1. Auxinas	20
3.4.2. Citoquinina	21
3.4.2. Interacción auxina-Citoquinina	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. MATERIALES	
4.1.1. Materiales de vidrio	24
4.1.2. Materiales de metal	24
4.1.3. Equipos	24
4.1.4. Reactivos	25
4.1.5. Reguladores de crecimiento	26
4.1.6. Material vegetal	27

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Ubicación del experimento.	27
4.2.1.1. Ubicación política.	27
4.2.1.2. Ubicación geográfica.	27
4.2.1.3. Duración del trabajo experimental	27
4.2.2. Descripción del experimento	28
4.2.3. Componentes en estudio	28
4.2.4. Combinación de factores	29
4.2.5. Obtención de plántulas de <i>Phalaenopsis amabilis</i>	
a condiciones de cultivo in vitro	29
4.2.5.1. Selección y preparación de las plantas madres	29
4.2.5.2. Primera etapa: Inducción de la	
embriogénesis somática – fase experimental	37
4.2.5.3. Segunda etapa: Multiplicación y	
desarrollo de callos	40
4.2.5.4. Tercera etapa: Desarrollo embrionario	42
4.2.5.5.- Cuarta etapa: Transformación de embrioides	44

4.3. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN	46
--------------------------------------	-----------

V. RESULTADOS

5.1. Porcentaje de callogenesis	48
5.2. Número de pro-embrioides en la región basal	49
5.3. Número de pro-embrioides en la región media	51
5.4. Número de pro-embrioides en la región apical	53
5.5. Número de embrioides en la región basal	55
5.6. Número de embrioides en la región media	57
5.7. Número de embrioides en la región apical	59
5.8. Número de plantas regeneradas en la región basal	61
5.9. Número de plantas regeneradas en la región media	63
5.10. Número de plantas regeneradas en la región apical	65
5.11. Caracterización de estructuras embriogénicas en	
<i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl.,	68

VI. DISCUSIONES	69
------------------------	-----------

VII. CONCLUSIONES	93
--------------------------	-----------

VIII. RECOMENDACIONES	95
IX. RESÚMEN	96
X. SUMMARY	97
XI. BIBLIOGRAFÍA	98
ANEXO	

INDICE DE FIGURAS

Página

1. Efectos generales de la interacción auxina-citoquinina	23
2. Cápsulas de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl.	30
3. Remoción y corte de las zonas necróticas de la cápsulas	31
4. Desinfección del material vegetal	32
5. Homogeneización de las semillas	34
6. Esterilización de la cuchara	34
7. Desinfección de la pinza	34
8. Plántulas de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl.	36
9. Stock y hormonas preparados	38
10. Sucrosa y agar agar	38
11. Preparación del medio de cultivo	38
12. Medio de cultivo para autoclavar	38
13. Medio de cultivo autoclavado	38
14. Medio de cultivo solidificándose	38
15. Extracción de la hoja de la planta madre	39
16. Explantes de segmentos foliares según región	40
17. Tubos cubiertos con papel aluminio	40
18. Material vegetal para incubación	40
19. Iniciación de callogénesis	46
20. Formación de callogénesis	46
21. Formación de pro-embrioides	46

22. Transformación de pro-embrioides	46
23. Formación de embrioides	47
24. Diferenciación de embrioides	47
25. Formación de plántulas	47
26. Plántulas regeneradas	47
27. Caracterización de estructuras embriogénicas en	
<i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl.	68

INDICE DE CUADROS

	Página
1. Combinación de factores	29
2. Análisis de varianza para la formación de pro-embrioides a partir de segmentos foliares de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl., en la región basal	49
3. Análisis de varianza para la formación de pro-embrioides a partir de segmentos foliares de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl., en la región media	51
4. Análisis de varianza para la formación de pro-embrioides a partir de segmentos foliares de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl., en la región apical	53
5. Análisis de varianza para la formación de embrioides a partir de segmentos foliares de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl., en la región basal	55
6. Análisis de varianza para la formación de embrioides a partir de segmentos foliares de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl., en la región media	57
7. Análisis de varianza para la formación de embrioides a partir de segmentos foliares de <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl., en la región apical	59

8. Análisis de varianza para la regeneración de plantas a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región basal 61
9. Análisis de varianza para la regeneración de plantas a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región media 63
10. Análisis de varianza para la regeneración de plantas a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región apical 65

INDICE DE GRÁFICOS

	Página
1. Porcentaje de callogénesis en la región basal	48
2. Porcentaje de callogénesis en la región media	48
3. Porcentaje de callogénesis en la región apical	49
4. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (A), evaluados a los 45 días en la región basal.	50
5. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 45 días en la región basal.	50
6. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (A) y concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 45 días en la región basal.	51
7. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (A), evaluados a los 45 días en la región media.	52
8. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 45 días en la región media.	52
9. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (A) y concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 45 días en la región media.	53
10. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (A), evaluados a los 45 días en la región apical.	54
11. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 45 días en la región apical.	54
12. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (A) y concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 45 días en la región apical.	55
13. Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (A), evaluados a los 90 días en la región basal.	56

14.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 90 días en la región basal.	56
15.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (A) y concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 90 días en la región basal.	57
16.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (A), evaluados a los 90 días en la región media.	58
17.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 90 días en la región media.	58
18.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (A) y concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 90 días en la región media.	59
19.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (A), evaluados a los 90 días en la región apical.	60
20.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 90 días en la región apical.	60
21.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (A) y concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 90 días en la región apical.	61
22.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (A), evaluados a los 160 días en la región basal.	62
23.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 160 días en la región basal.	62
24.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (A) y concentración de thidiazuron (B), evaluados a los 160 días en la región basal.	63
25.	Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (A), evaluados a los 160 días en la región media.	64

- 26.** Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (**B**), evaluados a los 160 días en la región media. **64**
- 27.** Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (**A**) y concentración de thidiazuron (**B**), evaluados a los 160 días en la región media. **65**
- 28.** Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacetico (**A**), evaluados a los 160 días en la región apical. **66**
- 29.** Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazuron (**B**), evaluados a los 160 días en la región apical. **66**
- 30.** Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para la interacción ácido naftalenacetico (**A**) y concentración de thidiazuron (**B**), evaluados a los 160 días en la región apical. **67**

I. INTRODUCCIÓN

El género *Phalaenopsis* forma parte de un grupo diverso de orquídeas muy apreciados por el color y durabilidad de sus flores. A diferencia de otras especies de orquídeas, la reproducción es difícil, ya que su crecimiento monopodial lento a dificultado la multiplicación vegetativa de materiales selectos y la reproducción sexual se ha visto agravada en algunos híbridos (Gil, 1987).

Entre los principales países productores de orquídeas cabe destacar: Brasil, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Países Bajos y Tailandia. Alrededor del 75 % de las orquídeas comercializadas a nivel mundial pertenecen al género *Phalaenopsis*. Estas orquídeas sin pseudobulbo, tienen raíces largas, con hojas suculentas y crecimiento monopodial. Las flores están agrupadas en racimos que nacen de la axila de las hojas, pueden ser de color blanco, rosa, lila o amarillo, y se conservan en buen estado entre 6 a 10 semanas, lo que las convierte en plantas ornamentales apropiadas para interior (Harper, 2004).

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta y brindarle las condiciones físicas y químicas de forma artificial a fin de que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Thorpe, 1981).

Uno de los problemas identificados en realizar la siembra de cápsulas que son autopolinizadas o son de polinización cruzada es que no se llega a obtener plantas con las características genotípicas y fenotípicas idénticas, de igual manera con la embriogénesis somática directa como técnica permite optimizar la obtención de

plantas selectas, por tratarse de una descendencia clonal, asimismo a partir de segmentos foliares lograremos obtener estructuras capaces de generar clones idénticos.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL.

- Desarrollar una metodología para la inducción de la embriogénesis somática directa en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., a partir segmentos foliares.

2.2. OBJETOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la concentración hormonal de ANA (ácido naftalenacético) y Thidiazurón [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea] para la inducción de la embriogénesis somática directa.
- Caracterizar formas y tipos de estructuras embrionarias obtenidas durante el proceso de la embriogénesis directa en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

3.1.1. Origen y distribución

El género *Phalaenopsis* incluye unas 70 especies y numerosos híbridos cultivados, con flores de diversos tamaños y colores, existen miles de híbridos de las especies originales, estas son las que vemos en tiendas de flores y supermercados, estas especies de orquídea son más conocidas. Por su género en el cual tiene su centro de origen que comprende desde el sur de China hasta el Noreste de Australia, incluyendo en medio Filipinas, Indonesia, Sumatra, Borneo. Generalmente crecen a baja altitud, de forma epífita, pegadas en la parte baja de árboles con pocas hojas y cerca de fuentes o cursos de agua. Algunas especies crecen de forma litofítica sobre rocas cubiertas de musgo (Harper, 2004).

3.1.2. Clasificación botánica

Según (Blume, 1825), mencionan la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	:	Vegetal
División	:	Magnoliophyta
Sub – División	:	Angiospermas
Clase	:	Monocotiledoneas
Orden	:	Asparagales
Familia	:	Orchidaceae
Sub familia	:	Vandoideae
Tribu	:	Vandaeae
Sub tribu	:	Aeridinae
Género	:	<i>Phalaenopsis</i>
Especie:		<i>amabilis</i> (L.) Blume (1825).

La popularidad de *Phalaenopsis*, naturalmente, dio lugar a la creación de numerosos híbridos artificiales. El primer híbrido (*Phalaenopsis intermedia*) fue creado en 1875, cuando John Seden en Veitch y rimas (Hijo) en Inglaterra cruzaron *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., con equestris *Phalaenopsis* Rchb (Veitch, 1886). La semilla fue sembrada en la base de la planta madre, y sólo una semilla que floreció sobrevivió una década más tarde, en 1886. En 1900, otros 13 híbridos de primaria fueron creados y flores. John Seden fue responsable de crear todos menos uno de estos híbridos. El énfasis en la hibridación en este momento era la creación de plantas de salón exóticas.

3.1.3. Morfología general

(Harper, 2004), menciona algunas características morfológicas:

Planta casi exclusivamente epífita, es decir que viven adheridas sobre los troncos o ramas de los árboles, los usan de apoyo y anclaje, con sus fuertes y largas raíces se aferran fuertemente a la corteza y pueden resistir a fuertes vientos.

Las **hojas** basales más viejas se caen al mismo tiempo. La planta retiene de éste modo de cuatro a cinco hojas. Las hojas son de colores verde oscuro, moteados o con manchas azul grisáceo.

El **rizoma** se desarrolla erecto y en su extremo produce dos gruesas y succulentas hojas alternas y elípticas cada año.

Las **raíces** son gruesas y están recubiertas por un tejido esponjoso llamado velamen que ayuda a la absorción de agua y nutrientes. Por dentro está la auténtica raíz, que contiene clorofila y presenta color verde.

Las **flores** constan de 3 sépalos similares a los pétalos, 3 pétalos con uno de ellos, el inferior distinto, que forma el denominado labelo y en medio de ellos está la columna (fusión de los estambres y pistilos). Florecen 2 ó 3 veces al año dependiendo de su cultivo, su floración puede durar de 6 a 10 semanas.

3.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO

3.2.1. Generalidades

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano), se cultivan asépticamente en un medio de composición química definido, incubándose a condiciones ambientales controladas. Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro*, son numerosos y diferentes. Resumiéndose así en:

- a) estudios básicos en fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines.
- b) bioconversión y producción de compuestos útiles.
- c) incremento de la variabilidad genética.
- d) obtención de plantas libres de patógenos.
- e) propagación de plantas.
- f) conservación e intercambio de germoplasma.

Las técnicas del cultivo *In vitro* contribuyeron no solo a un mejor entendimiento de los eventos de diferenciación celular, si no a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. Al igual que otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre cultivada *in vitro* son clones, es decir copias genéticamente iguales entre ellas e idénticas a la madre. En plantas propagadas por semilla la

descendencia no es clonal, pues cada semilla tiene su propia base genética que resulta de la recombinación de genes de ambos progenitores **(Roca y Mroginski, 1991)**.

Para el establecimiento de cultivares a condiciones in vitro se deben tener consideraciones generales sobre: explante; normas de asepsia; los medios de cultivo y condiciones ambientales de incubación, la interacción de estos factores determinará la respuesta que se obtenga in vitro.

a) Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada **(Roca y Mroginski, 1991)**.

b) Asepsia

La asociación explante - medio cultivo y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos si no en su ulterior incubación y manipulación **(Roca y Mroginski, 1991)**.

(Maglietti *et al.*, 2006; Mroginski *et al.*, 2006; Fontana *et al.*, 2006), lograron desinfectar superficialmente hojas inmaduras del genero *Arachis correntina*, *Arachis villosa*, *Arachis burkatii*, utilizando etanol 70% durante 30 segundos, seguida por una inmersión en una solución de NaOCl al 1% más una gota de Tween 20 durante 12 minutos.

c) Medios de Cultivo

En la actualidad existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que se suministran a base de: a) carbono; b) nutrimentos minerales; c) vitaminas; d) agente gelificante (en el caso de medios semisólidos); e) sustancias reguladoras de crecimiento; f) otros compuestos; generalmente se hace referencia al conjunto de componentes (a+b+c), como el medio basal (MB) (Roca y Mroginski, 1991).

d) Condiciones ambientales de incubación

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a luz y temperatura, estos dos factores están relativamente poco estudiados y la información existente sobre ellos suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria (Roca y Mroginski, 1991).

3.3. MÉTODOS PARA LA MICROPROPAGACIÓN

Existen muchos métodos para realizar la micropropagación como: a) el cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares; b) la organogénesis directa; c) la organogénesis indirecta; d) la embriogénesis somática; e) los órganos de perennidad; f) el micro injerto y g) el cultivo de embriones, semillas y esporas (**Delgado y Rojas, 1999**). Todos estos métodos presentan ventajas y problemas desde el punto de vista de su multiplicación y fidelidad genética del material propagado (**Krikorian, 1991**).

3.3.1. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es tal vez la más impresionante y espectacular demostración de la persistencia de la totipotencia celular en las plantas superiores, al obtenerse una planta integra a partir de embriones somáticos. Los primeros estudios fueron realizados independientemente, por (**Steward et al., 1958**) y (**Reinert 1958; 1959**), utilizando callos de zanahoria derivados de raíces de almacenamiento (**Delgado y Rojas, 1999**).

Tisserat et al., (1979), reportó la formación de embriones somáticos en 32 familias, 81 géneros y 132 especies. En la actualidad este número ha crecido de manera impresionante. Pero no solo las células esporofíticas han exhibido la potencialidad de formar embriones somáticos si no también en células generativas de las microsporas de las anteras, tal como lo demostraron (**Guha y Maheshwari, 1964**) en

Datura innoxia y (Nitsch, 1969) en *Nicotiana tabacum* (Delgado y Rojas, 1999).

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos, son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser capaces de crecer y formar plantas completas (Gómez, 1998).

Se diferencia de la micropropagación por ápices caulinares y la regeneración de órganos por organogénesis, en que en estos últimos procesos el ápice u órgano formado es unipolar (Delgado y Rojas, 1999). Las características del embrión somático según (Sannasgala, 1989, Escalant y Teissont, 1989) son:

- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis).
- Es una estructura bipolar con un ápice radical, apical y cotiledonales.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

3.3.1.1. Modelos de desarrollo y origen de la embriogénesis somática

Han sido reconocidos dos modelos de desarrollo de la embriogénesis somática *in vitro*:

- Embriogénesis somática directa, en la cual los embriones somáticos se originan directamente de los tejidos, sin la formación del callo;
- Embriogénesis somática indirecta, en la cual el callo es formado, mantenido y proliferado antes del desarrollo de los embriones somáticos. En ambos casos de embriogénesis somática la secuencia del desarrollo embrionario es similar a la formación de un embrión zigótico, es decir, los estadios globular, torpedo y acorazonado, seguida por la formación de plantas integra (Delgado y Rojas, 1999).

(Sharp *et al.*, 1980) indicaron que la embriogénesis somática directa ocurre a partir de células pre-embriogénicas determinadas o “pre-embryogenic determined cells” (PEDC), las que se encuentran comprometidas con el desarrollo embriogénico, necesitando sólo un estímulo para su expresión; en tanto que la embriogénesis indirecta ocurre en células diferenciadas no embriogénicas o células determinadas embriogénicas inducidas o “induced embryogenic determined cells” (IEDC).

(Chen y Chang, 2006), logró obtener embriogénesis somática directa y regeneración de planta a partir de hojas enteras en *Phalaenopsis amabilis*. Asimismo obtuvo embriones a los 45 días de cultivo.

Por otro lado, la cuestión del origen unicelular o pluricelular de los embriones somáticos parece estar directamente relacionado con el comportamiento de las células (Delgado y Rojas, 1999); Hacias, (1978), definió al embrión somático como un individuo originado de una célula, sin presentar conexiones vasculares con los tejidos maternos, en tanto que (Raghavan, 1976) y (Tisserat *et al.*, 1979) indicaron que aparentemente los embriones somáticos se forman a partir de agregados de células embriogénicas o complejos proembrionarios, en especial en la embriogénesis indirecta vía callos o suspensiones celulares y que luego dan origen a uno o varios embriones somáticos.

Pero los embriones somáticos no sólo se forman de tales agregados embriogénicos o nódulos callosos (Vasil y Hildebrandt, 1966), sino también de células simples periféricas (Jones, 1974), de la segmentación de células múltiples (Linz y Conover, 1991) y por varios de los procesos indicados (Handro *et al.*, 1973; Lu y Vasil, 1981). En general, el origen pluricelular parece producir embriones somáticos

fusionados con el tejido maternal, en tanto que el origen unicelular produce embriones somáticos ligados al tejido maternal por estructuras similares a los suspensores de los embriones zigóticos (Delgado y Rojas, 1999).

3.3.1.2. Embriogénesis zigótica y embriogénesis somática

Aún cuando existe un modelo morfológico básico de embriogénesis zigótica entre las especies vegetales, una considerable variación ha sido observada cuando el estudio ha sido realizado de manera detallada (Steeves y Sussex, 1989).

En dicotiledóneas tomándose a la especie *Arabidopsis thaliana*, un miembro de las Brassicaceae (Cruciferae) como un modelo para la embriogénesis zigótica, donde su proceso de desarrollo embrionario dura de 11 a 12 días; después de la fertilización, el cigoto sufre una división transversal asimétrica hasta formar una célula apical relativamente pequeña y una célula basal más grande. El establecimiento de esta polaridad tendría una función determinante en el proceso puesto que la célula apical formará el embrión propiamente dicho y la célula basal formará el suspensor. La célula apical se divide, primero por dos divisiones en ángulo recto y luego por una división transversal, hasta formar una estructura con ocho células isodiamétricas denominado estado “octante”, en el cual las

células del propio embrión se organizan en dos hileras. La fila superior de las células formará el meristema apical y los cotiledones y la fila inferior el hipocótilo. El límite entre las dos hileras es denominado límite O'. El propio embrión se sitúa sobre la célula distal del suspensor, el que finalmente formará la raíz de la plántula o "seedling". Durante el estadio globular de desarrollo del embrión, que ocurre aproximadamente ocurre 2-3 días después de la fertilización, se generan alrededor de 30 células con un diámetro aproximado de 40 μm , luego sigue el estadio de corazón, con aproximadamente 250 células, 3-4 días después de la fertilización, el estadio torpedo, con aproximadamente 3,000 células, 4-5 días después de la fertilización, y finalmente el estadio de embrión zigótico maduro, con aproximadamente 20,000 células y 500 μm de longitud (Lindsey y Topping, 1993).

El desarrollo morfológico y temporal de los embriones somáticos es muy semejante a los embriones zigóticos. En zanahoria, el primer estadio reconocible es el estadio globular, a partir del cual el embrión somático inicia su crecimiento 5 a 7 días después del cambio a un medio sin auxinas (Halperin y Wetherell, 1965). Después de más de 2 a 3 días de crecimiento isodiamétrico, el estadio globular es seguido por un estadio oblongo (Schiavione y Cooke, 1985), cambiando el crecimiento isodiamétrico por un crecimiento

simétricamente bilateral e iniciándose el estadio de corazón. La transición globular - corazón es claramente marcada por un mayor crecimiento de los dos cotiledones, la elongación del hipocótilo y el inicio del desarrollo de la radícula. Este proceso continúa a través de los estadios de torpedo a planta en miniatura ("plantlet") (Delgado y Rojas, 1999).

3.3.1.3. Factores que influyen y controlan la embriogénesis somática

Aún cuando desde un comienzo fue demostrado que la presencia de una auxina, resultaba crítica para la iniciación de la embriogénesis y la baja concentración de auxina o su total ausencia favorecía la maduración de los embriones somáticos (Halperin, 1966), y que el nitrógeno reducido resultaba importante, tanto para la iniciación (Halperin y Wetherell, 1965); en la actualidad se reconocen otros factores como: el genotipo y la clase de explante; el medio de cultivo; nitrógeno; hormonas vegetales; condiciones ambientales; estado físico del medio y tipo de envase (Delgado y Rojas, 1999).

En el cultivo de tejidos las auxinas estimulan el alargamiento celular y el crecimiento del tallo; en combinación con las citoquininas estimulan la división celular y diversos procesos morfogénicos, también estimulan la diferenciación del floema

y xilema, así como la diferenciación de raíces y el desarrollo de raíces secundarias (Delgado y Rojas, 1999).

3.3.1.4. Fases de la embriogénesis somática

En general son reconocidas tres fases: a) inducción del callo embriogénico, b) inducción y maduración de los embriones somáticos y c) desarrollo del embrión somático en planta (Delgado y Rojas, 1999).

A) Inducción del callo embriogénico

Comprende desde la selección y desinfestación del explante, así como su inoculación en el medio de cultivo. Un hecho notable en este primer medio de cultivo es la persistencia de auxinas, en aproximadamente 60% de las especies revisadas por (Evans *et al.*, 1981) y (Ammirato, 1983), destacando el 2,4 D y en menor proporción el AIA y ANA (Chée y Cantliffe, 1988).

Numerosas angiospermas herbáceas han respondido favorablemente al proceso de inducción del callo embriogénico, en tanto que las especies leñosas se han mostrado muy recalcitrantes (Sommer *et al.*, 1975).

B) Inducción y maduración de los embriones somáticos

Es un segundo medio denominado medio secundario, carecido de auxinas en altas concentraciones con adición de algunas citoquininas y/o giberelinas, tiene como funcionalidad la formación de embriones somáticos en grandes cantidades y con la plasticidad de que rápidamente se puedan convertirse en plantas, fase que ha sido muy dificultosa en muchos sistemas (Delgado y Rojas, 1999).

Esta fase es la que muestra el desarrollo normal del embrión somático, destacado por la secuencia de cambios morfológicos: globular, acorazonado y torpedo, sin embargo es posible observar otras formas complementarias como la de torpedo tardío, cotiledonar y torpedo expandido como ocurre en la embriogénesis somática del camote (Chée y Cantliffe, 1989; Delgado, 1995). Pero el hecho de mayor significación es la ocurrencia de embriogénesis somática secundaria o repetitiva, es decir la formación de uno o más embriones somáticos sobre otro embrión somático (Delgado y Rojas, 1999).

C) Desarrollo de embriones somáticos en plantas

En esta fase, el embrión somático, que ha alcanzado el estadio de torpedo, se convierte en planta integra

potencialmente capaz de ser transferida a condiciones de campo (Delgado y Rojas, 1999).

(Chen y Chang, 2006), Desarrollo una metodología para la inducción de la Embriogénesis Somática Directa tomado como explantes hojas inmaduras enteras de *phalaenopsis amabilis* sembradas sobre un medio de cultivo de (Murashige y Skoog, 1962) a media concentración suplementado con myo-inositol (100), niacin (0.5), pyridoxine HCL (0.5), thiamine HCL (0.1), glycine (2.0), peptone (1000), NaH₂PO₄ (170), sucrosa (20000), y Gelrite (2200) y fitohormonas con diferentes concentraciones Acido naftalenacético (ANA) y thidiazurón (1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-urea (TDZ), obteniendo mejores resultados en el tratamiento (T₄= 0,00 mg/l ANA; 3,0 mg/l TDZ), con un promedio de 19,4 embriones después de los 45 días de haber realizado la siembra de hojas enteras *in vitro*, la regeneración de plantas se logró a los 160 días.

3.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos (luz, nutrientes, temperatura) e internos (fitohormonas). Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas, los cuales son

producidos en una parte de ella y transferidos a otras, en la cual influyen un proceso específico, mencionado por **(Hurtado y Merino, 1994)**. Las fitohormonas pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos, se incluyen al etileno, auxinas, giberelinas, citoquininas y el ácido abscísico, cada uno con una estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta, de las cuales exhiben propiedades fuertes de regulación de crecimiento en plantas y secciones cortadas de éstas **(Gonzales y Raciman, 2003)**.

El efecto de la aplicación exógena de los reguladores de crecimiento sobre el crecimiento y desarrollo de células, tejidos y órganos está fuertemente influenciado por otros factores como las condiciones ambientales de cultivo, el tipo de explante y el genotipo **(Delgado y Rojas, 1999)**.

3.4.1. Auxinas

Se sintetizan principalmente en el ápice del tallo y las ramas jóvenes, en las yemas y hojas jóvenes, y en general en los meristemas **(Taiz y Zeiger, 2004)**. Tienen la capacidad de producir alargamiento celular, sin embargo se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en tejidos vegetales. Frecuentemente fomentan el desarrollo de callos y generalmente ejercen el control primario en el crecimiento de tallos y raíces **(Hurtado y Merino, 1994)**.

Las auxinas son los únicos reguladores de crecimiento que aumentan consistentemente la formación de primordios radicales, pero menos

en tejidos que naturalmente presentan cierta predisposición al enraizamiento (**Haissig, 1974**). Además, las auxinas intervienen en el crecimiento del tallo, inhibición de yemas laterales, abscisión de hojas y de frutos, activación de las células del cambium y otras (**Salisbury, 2000**).

Las concentraciones de auxinas utilizadas en el cultivo de tejidos es variable, por lo general el ácido naftalenacético (ANA) es utilizado entre 0,1-10 mg/l, según (**Delgado y Rojas, 1999**).

3.4.2. Citoquininas

Las citoquininas han presentado otros efectos en los procesos fisiológicos de crecimiento, incluyendo la senescencia foliar, movilización de nutrientes, dominancia apical, formación y actividad de meristemos apicales, desarrollo floral, germinación de semillas, también parecen mediar muchos aspectos de desarrollo regulado para la luz, incluyendo la diferenciación de cloroplastos, o desarrollo de metabolismo autotrófico y la expansión de hojas y cotiledones (**Taiz y Zeiger, 2004**).

La citoquinina se encuentra presente como moléculas libres (ligadas covalentemente a cualquier macromolécula) en plantas con ciertas bacterias, han sido encontradas en grandes variedades de angiospermas, probablemente, sean de un grupo diversificado de

plantas, estas fueron encontradas también en algas, musgos y coníferas (Taiz y Zeiger, 2004).

Las concentraciones de citoquininas utilizadas en el cultivo de tejidos se encuentran en un rango de 0,1-3,0 mg/l, según (Delgado y Rojas, 1999).

El efecto del Thidiazurón [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea] (TDZ), en la propagación *in vitro* de *Doritaenopsis* desarrollados dieron como resultados los brotes múltiples con los niveles más altos de TDZ produciendo protocormos, alargamiento y desarrollo de la raíz, mientras que una mayor proliferación ocurre al aumentar la concentración de TDZ. Observándose efectos similares con protocormos de *Phalaenopsis* en un rango inferior (0,23-1,14 mg/l) de TDZ (Ernst, 1994).

3.4.3. Interacción auxina-citoquinina

El proceso de crecimiento y diferenciación en cultivo de tejidos es dramáticamente afectado por la interacción auxina-citoquinina, habiendo sido ampliamente aceptado que las plantas regulan los niveles de auxinas y citoquininas por el proceso de síntesis y conjugación. Así, el incremento del nivel de citoquinina, biológicamente activa, es por desconjugación de N-glucósidos inactivo. En general, las concentraciones altas de auxinas y bajas de citoquininas estimulan la división celular, en tanto que las concentraciones bajas de auxinas y

altas de citoquininas estimulan el crecimiento celular (Skoog y Miller, 1957).

Para la inducción de callos y la formación de embriones se utilizó la interacción auxina (ANA) y citoquinina (TDZ), asimismo para la regeneración de plantas se uso citoquinina (TDZ) en diferentes concentraciones (Chen y Chang, 2006).

Según (George y Sherrington, 1984), mostraron en la (figura 01), los efectos generales de la interacción auxina-citoquinina en la inducción del proceso morfogénico en cultivo de tejidos.

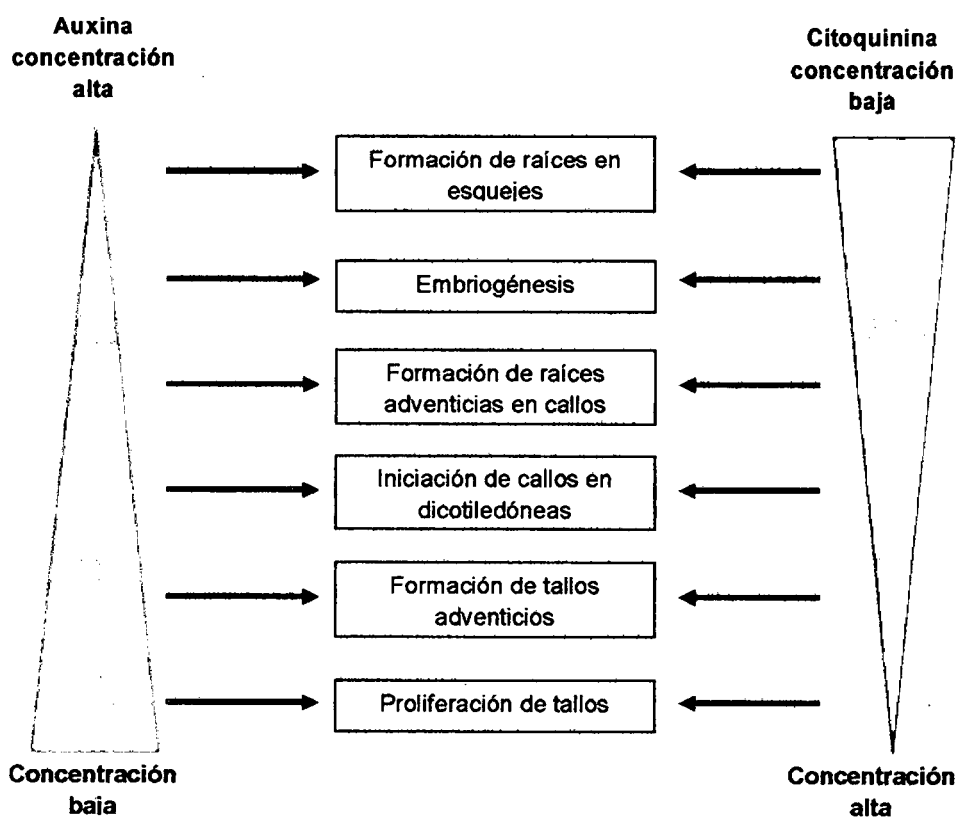


Figura 01: Efectos generales de la interacción auxina-citoquinina (George y Sherrington, 1984)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Materiales de vidrio

- Frascos autoclavables de 15 onz.
- Tubos de ensayo de 25 x 150 mm
- Pipetas DIN/B de 25, 10, 5 y 1 ml
- Erlenmeyer pirex de 500, 250 y 125 ml
- Bageta pirex de 30 cm
- Vaso de precipitado kimax de 500 y 1000 ml
- Mechero de Bunsen

4.1.2. Materiales de metal

- Pinzas de acero inox stainless punta roma de 143,0 y 200,0 mm de longitud.
- Espátula de bronce de 293,0 mm de longitud
- Mango para hoja de bisturí N° 10, 11 y 14 de acero inox stainless de 165 mm de longitud
- Hojas de bisturí KIP N° 10, 11 descartables

4.1.3. Equipos

- Autoclave vertical sercal de 40 ℓ de capacidad
- Agitador magnético con calentamiento (CAT HOTPLATE STIRRER M6 de 1600 rev/min y 300°C)
- Estereomicroscopio nikon SMZ645 (0,8X - 5X)

- Potenciómetro schot.
 - Cámara de flujo laminar horizontal
 - Destilador de agua sercal de 12 l/hora
 - Refrigerador LG icebeam door cooling, -20°C
 - Aire acondicionado LG tipo ventana de 24000 BTU.
 - Incubador fisher científico (0-100 °C)
 - Balanza analítica ADAM EQUIPMENT
 - Termómetro de máxima-mínima Stortz MMT-15/17.
 - Cámara digital nikon coolpix P5100 de 12.0 megapixels.
 - Adaptador de cámara para estereomicroscopio nikon coolpix MDC2
- Lens

4.1.4. Reactivos

- Nitrato de amonio (NH_4NO_3)
- Nitrato de potasio (KNO_3)
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Ioduro de potasio (KI)
- Sulfato de manganeso heptahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Ácido bórico (H_3BO_3)
- Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

- Ácido etilendiaminotetracético dihidratado ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico (35%) de pureza.
- Ácido nicotínico
- Ácido bifosfato de sodio (NaH_2PO_4)
- Piridoxina-HCl
- Tiamina-HCl
- Myo-inositol
- Niacin
- Agua destilada
- Agua destilada estéril
- Carbón activado
- Agua de coco
- Sucrosa
- Agar agar
- Lejía comercial al 5,25% de NaOCl
- Pastillas buffer pH= 4,0; pH= 7,0
- Alcohol etílico de 96°

4.1.5. Reguladores de crecimiento

- Ácido Naftalenacético (ANA)
- Thidiazurón [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea]

4.1.6. Material vegetal

Se utilizó hojas jóvenes de plántulas *in Vitro* de 210 días producidas en el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales.

4.2. METODOLOGÍA

4.2.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto; perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias.

4.2.1.1. Ubicación política

Departamento : San Martín

Provincia : San Martín

Distrito : Morales

4.2.1.2. Ubicación geográfica

Latitud sur : 06° 29' 13,2"

Latitud oeste : 76° 22' 48,4"

Altitud : 350 m.s.n.m

4.2.1.3. Duración del trabajo experimental

El estudio de investigación tuvo una duración de 12 meses ejecutándose entre los meses de Noviembre del 2008 a Octubre del 2009.

4.2.2. Descripción del experimento

El desarrollo del presente trabajo de investigación comprendió una fase de inducción de la embriogénesis somática directa en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., a partir de segmentos foliares, para esta prueba se usó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 3 x 4: Factor (A): Acido Naftalenacético (0,00; 0,10; 1,00 mg/l) y Factor (B): Thidiazurón [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea] (0,00, 1,00, 2,00, 3,00 mg/l), en el cual la unidad experimental fue de 01 tubo de ensayo de 25 x 150 mm., con medio de cultivo inclinado conteniendo 03 segmentos foliares de diferentes regiones (base, medio y ápice) de 12,0 x 1,7 mm/segmento, con 12 tratamientos y 3 repeticiones por tratamiento.

4.2.3. Componentes en estudio

a) Concentraciones de ANA – Factor (A)

$$a_1 = 0,00 \text{ mg/l}$$

$$a_2 = 0,10 \text{ mg/l}$$

$$a_3 = 1,00 \text{ mg/l}$$

b) Concentraciones de TDZ – Factor (B)

$$b_1 = 0,0 \text{ mg/l}$$

$$b_2 = 0,10 \text{ mg/l}$$

$$b_3 = 1,00 \text{ mg/l}$$

$$b_4 = 3,00 \text{ mg/l}$$

4.2.4. Combinación de factores

Cuadro 01: Combinación de Fitohormonas

Tratamientos	Clave	Factor (A)	Factor (B)
		[] ANA mg/l 1 000 ppm	[] TDZ mg/l 1 000 ppm
T ₁	a ₁ b ₁	0.00	0.00
T ₂	a ₁ b ₂	0.00	0.10
T ₃	a ₁ b ₃	0.00	1.00
T ₄	a ₁ b ₄	0.00	3.00
T ₅	a ₂ b ₁	0.10	0.00
T ₆	a ₂ b ₂	0.10	0.10
T ₇	a ₂ b ₃	0.10	1.00
T ₈	a ₂ b ₄	0.10	3.00
T ₉	a ₃ b ₁	1.00	0.00
T ₁₀	a ₃ b ₂	1.00	0.10
T ₁₁	a ₃ b ₃	1.00	1.00
T ₁₂	a ₃ b ₄	1.00	3.00

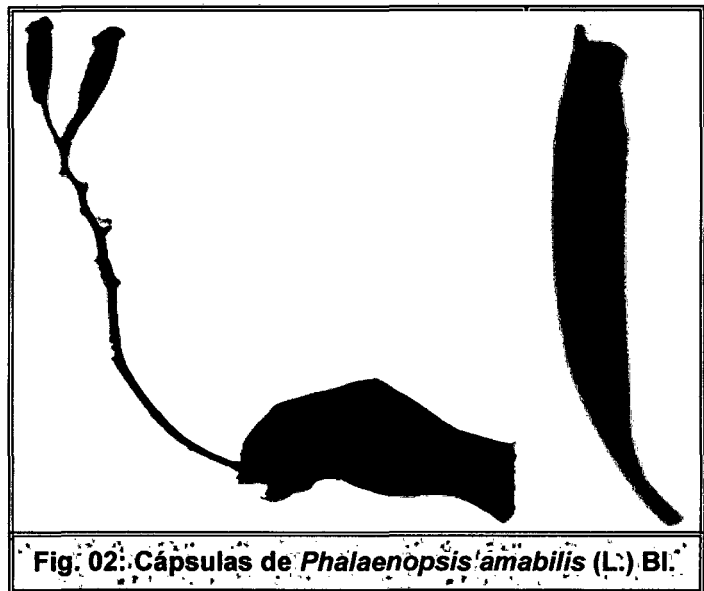
Nota: Los tratamientos puestos en estudio fueron probados en segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., de las regiones basal, medial y apical.

4.2.5. Obtención de plántulas de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., a condiciones de cultivo in vitro.

4.2.5.1. Selección y preparación de las plantas madres

Selección de las cápsulas

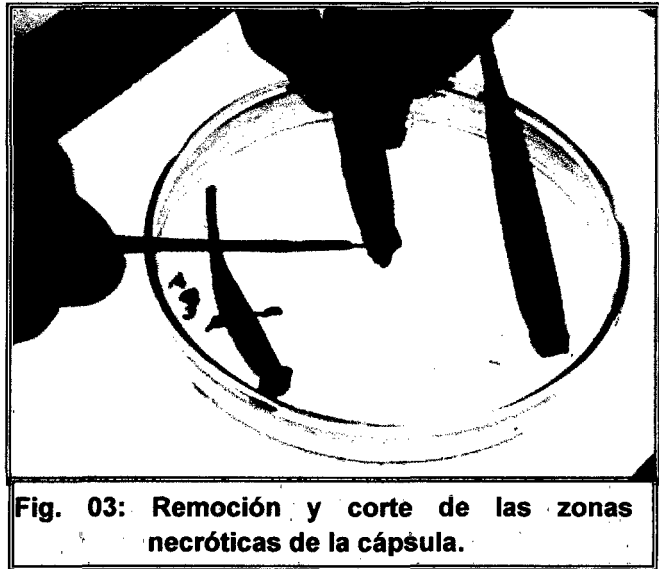
La obtención de la cápsula de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., se hizo cuando la flor polinizada luego de unos meses haya formado la cápsula, esto se colecto y coloco en un sobre de papel para su posterior preparación para la siembra, anotando el día que se colecto, la especie, el lugar y el colector.



Lavado y preparado del material vegetal

Es el primer paso para la introducción del material vegetal a condiciones in Vitro que consiste en separar la cápsula verde de la planta madre, para luego lavar con una escobilla pequeña de dientes suaves, con el cual se limpio la superficie de la cápsula esto se hizo en presencia de agua jabonosa después se enjuago con agua entubada.

Después de finalizar el lavado de las cápsulas, se procedió a observar detenidamente a la cápsula con la finalidad de identificar zonas necróticas, los cuales se removi6 con la ayuda de un bistur6 (N° 10 - 11), tratando de no dañar la parte interior de la cápsula donde se encuentra la semilla.



Preparación de la solución desinfectante para cápsulas de orquídeas.

Se preparó una solución de NaOCL al 1% (20 ml de lejía comercial (5,25% NaOCl) en 100 ml de agua destilada), con la finalidad de desinfectar el material vegetal a usar, se aseguro con esto que las cápsulas estén libres de agentes contaminantes, posteriormente se sembró usando la cámara de flujo laminar en envases que contengan medios de cultivo semisólidos.

La solución que se uso como desinfectante es la lejía comercial (Hipoclorito de Sodio al 5.25%). Para disminuir la concentración de la lejía comercial de 5.25% de NaOCl se utilizo la siguiente fórmula:

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

Donde: V_1 : volumen inicial

V_2 : volumen final

C_1 : concentración inicial

C_2 : concentración final

- El volumen inicial (V_1 en ml.), es el volumen requerido de lejía comercial.
- La concentración inicial (C_1 en porcentaje), es la concentración de hipoclorito de sodio de la lejía comercial (5.25% de NaOCl).
- El volumen final (V_2 en ml.), es el volumen de agua destilada requerido.
- La concentración final (C_2 en ml.), es la concentración esperada.

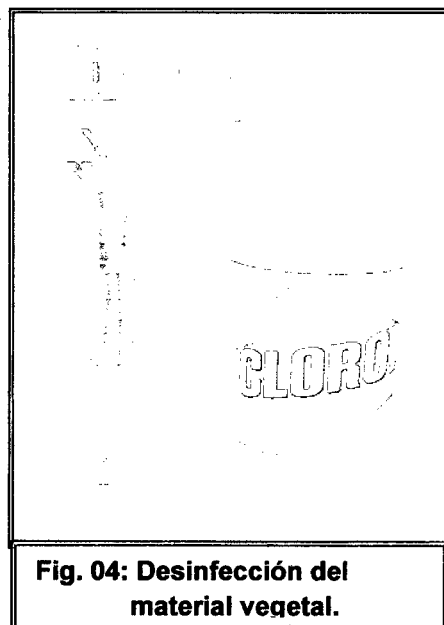


Fig. 04: Desinfección del material vegetal.

- Se dispense la solución desinfectante obtenida en frasco de vidrio, se colocho el material vegetal dentro la solución desinfectante por 20 minutos, se agito la solución desinfectante más el material vegetal con la finalidad de que la solución cubra toda el área del material vegetal.

Antes de ingresar el frasco a la cámara de flujo laminar, limpiar la superficie del frasco con algodón y alcohol al 96%, con la finalidad de evitar contaminación.

Extracción de las semillas de la cápsula

En el interior de la cámara de flujo, una vez pasado el tiempo de la desinfección de la cápsula esto se retiro con ayuda de las pinzas largas, cogiéndolas preferentemente de lo que queda del peciolo.

Luego se sumergió en alcohol al 96 % para después pasar rápidamente por el fuego (flamear). Se Deja que el alcohol se inflame completamente luego se dejo que la cápsula y las pinzas se enfríen.

Se procedió después a transferir la cápsula a una superficie desinfectada (placa petri esterilizada). Con ayuda de un bisturí se hizo cortes siguiendo las líneas longitudinales en las cápsulas. Se utilizo una hoja de bisturí nueva para cada cápsula y así prevenir la propagación de virus.

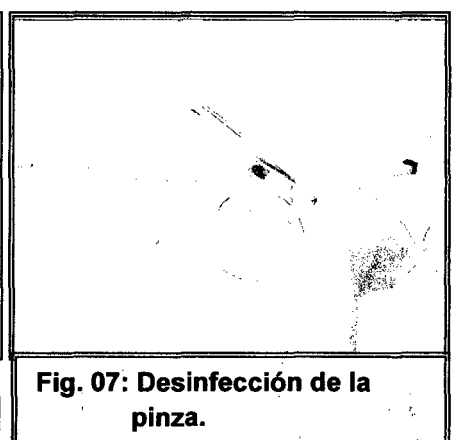
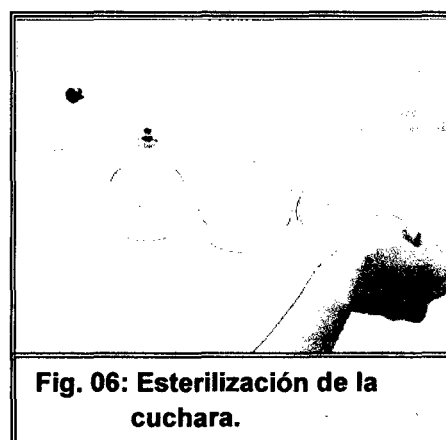
Una vez realizado el procedimiento anterior se procedió a tomar con ayuda de la pinza cada segmento de la cápsula, Se levanto uno de los segmentos de la cápsula con las pinzas y se golpeo ligeramente sobre un matraz conteniendo agua destilada estéril, se removió constantemente con una

cucharilla de mango largo antes de cada siembra para homogeneizar la cantidad de semillas al momento de sembrar.



En caso de sobrar semillas, estas se colocaron en un matraz pequeño con agua destilada estéril para su disposición en otro momento.

Para la siembra se empleo una cucharilla adaptada de mango largo, y una pinza corta, los cuales se proceden a flamear antes de iniciar la siembra en los envases de vidrio que para este caso son frascos de 15 onzas.



Luego se procedió a flamear el papel aluminio que cubre la boca del frasco, con la pinza corta se procedió a sacar la tapa de aluminio.

Después de retiradas las tapas y antes de la siembra se flameo bien la boca del frasco, luego tomamos con la cucharilla un poco de las semillas contenidas en el matraz y se procedió a ingresarlas por la boca del frasco para su siembra en el medio de cultivo.

Una vez terminada la siembra se flameo primero la boca del frasco, después colocamos la tapa de aluminio y la flameamos.

Cubrimos todas las tapas con cinta plástica para darle un cierre más hermético, finalmente se tapo con papel cortado y sujetamos con hilo pabilo.

Transferencia y repique de protocormos hasta obtener plántulas para el presente trabajo de investigación.

Luego de haber sembrado la cápsula dehiscente de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., se esperó que transcurra 55 días para realizar la transferencia de embriones al medio formulado por (Murashige y Skoog, 1962) a media concentración, suplementado con 0,4 mg/l de Tiamina - HCl, 0,5 mg/l de Ácido Nicotínico, 20,0 g/l de Sucrosa, 7,0 g/l de

Agar-agar. Esto se realizó para refrescar embriones germinados, luego de transcurrir 50 días se transfirieron los protocormos con diferenciación de hojas a un medio de cultivo formulado por (Murashige y Skoog, 1962) a media concentración, suplementado con 0,4 mg/l de Tiamina - HCl, 0,5 mg/l de Ácido Nicotínico, 20,0 g/l de Sucrosa, 7,0 g/l de Agar-agar, 100 ml endosperma liquido de coco (ELC), enraizar con agua destilada esteril ($H_2O_{(d)}$) a 1000 ml.

Después de haber realizado la germinación y la obtención de plántulas a partir de semillas pasaron 210 días para seleccionar el frasco con las mejores plantas que tengan color y tamaño de hoja para realizar la extracción de hojas inmaduras de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

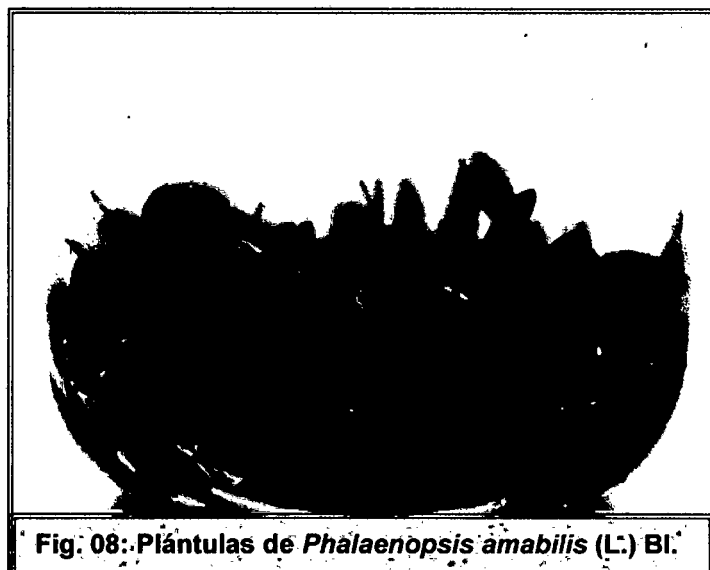


Fig. 08: Plántulas de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

4.2.5.2. Primera etapa: Inducción de la embriogénesis somática – fase experimental

Medio de cultivo

La primera etapa consistió en la inducción embriogénesis somática, para lo cual se preparó un volumen inicial de 2,0 ℓ de solución de (Murashige y Skoog, 1962) a media concentración, al cual se le adicionó, 20,00 mg/ℓ Myo-inositol, 1,00 mg/ℓ Pyridoxine, 0,20 mg/ℓ Thiamine, 4,0 mg/ℓ Glycine, 340,00 mg/ℓ NaH₂PO₄, 4,0 g/ℓ Peptona, 40,00 g/ℓ de sucrosa, 6,75 g/ℓ de Agar - Agar fraccionada en 12 partes (de 150 ml cada uno), al cual se les agregó diferentes concentraciones de Ácido Naftalenacético (ANA) (0,00; 0,10; 1,00 mg/ℓ) y thidiazurón (TDZ) (0,00; 0,10; 1,00; 3,00 mg/ℓ), realizando la combinación de tratamientos puesto en estudio en el (cuadro 01); calibrando el pH a 5,2 para todos los tratamientos.

Estos fueron dispensados en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con un volumen de 12 ml por tubo de ensayo, los cuales fueron cerrados con tapa plástica, luego autoclavados a una presión de 15 lb por 20 minutos hasta alcanzar una temperatura de 121 °C; siendo posteriormente llevados a la cámara de flujo laminar para envolver con kling wrap entre la tapa y el tubo de ensayo luego dejarlo inclinados en un ángulo

(30°-45°)para que se enfríe a temperatura ambiente y almacenados en refrigeración a una temperatura de 20 °C. Para la preparación de este medio se utilizó el procedimiento sugerido por (Chen y Chang, 2006).

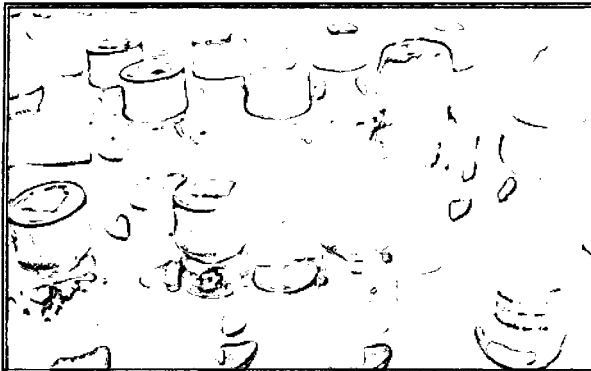


Fig. 09: Stock y fitohormonas preparados

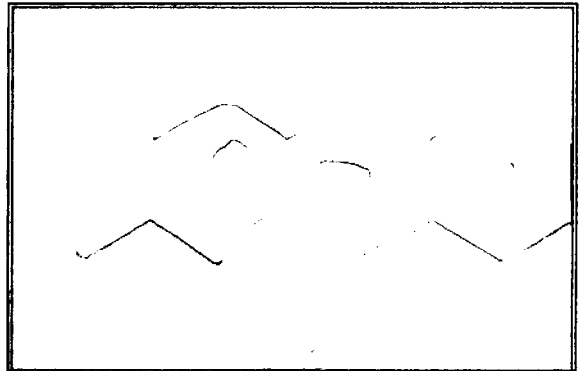


Fig. 10: Sucrosa y Agar agar



Fig. 11: Preparación del medio de cultivo

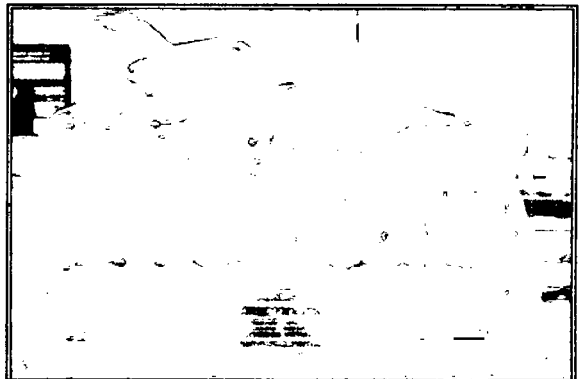


Fig. 12: Medio de cultivo para autoclavar



Fig. 13: Medio de cultivo autoclavado

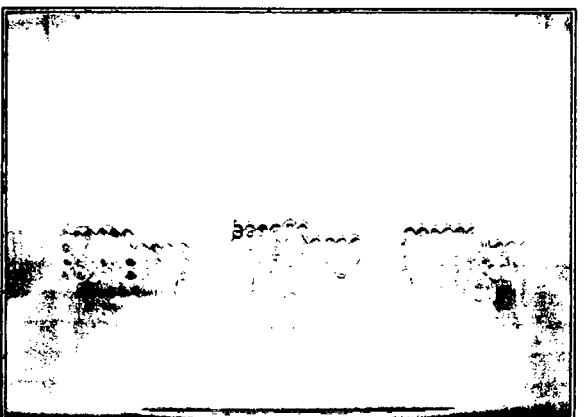


Fig. 14: Medio de cultivo solidificándose

Extracción del material vegetativo

Luego de haber preparado las plantas donantes, con ayuda de cámara de flujo laminar, un mango de bisturí N° 14, una lamina de hoja fina, una pinza mediana de punta roma, una pinza de mango largo, una pinza de mango corto, mango de bisturí N° 11, una hoja de bisturí N° 10, dos placas petri, un matraz con agua destilada esteril, un mechero de Bunsen, un aspersor, un porta objetos con alcohol y algodón, previamente desinfectadas con alcohol a 96°, se extrajeron hojas inmaduras de las partes terminales de 1,5 cm de longitud en una placa petri, conteniendo agua destilada estéril para evitar el estrés producto del corte efectuado.



Siembra de explantes

Se extrajeron las hojas inmaduras de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., que se encontraban en placas petri con agua destilada estéril para luego ser seccionada en segmentos foliares: basal, medio y apical (12 x 1,7 mm) sembrados en tubos de ensayo 25 x 150 mm conteniendo el medio de cultivo preparado para la prueba de inducción de callos.

En este primer medio nutritivo permanecieron 45 días que fue el tiempo para inducir la formación de embrioides del explante.

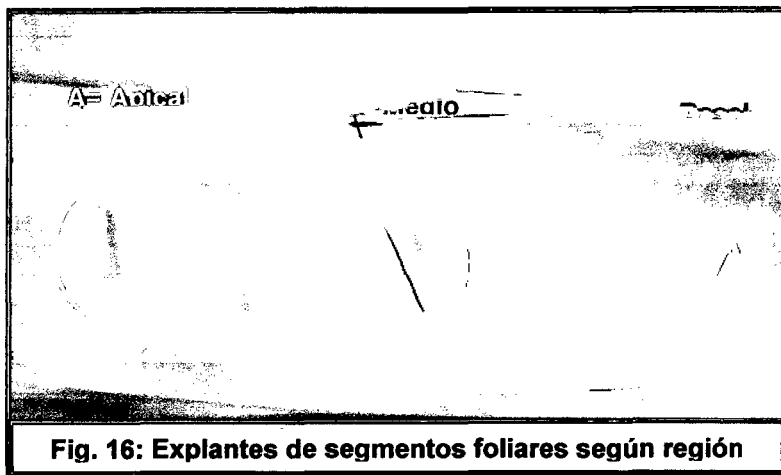


Fig. 16: Explantes de segmentos foliares según región

Incubación de explantes.

Los explantes fueron incubados a una temperatura promedio de $24^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, H.R: 46% y 24 horas de oscuridad.



Fig. 17: Tubos cubierto con papel aluminio



Fig. 18: Material vegetal para incubación

4.2.5.3. Segunda etapa: Multiplicación y desarrollo de callos

Medio de cultivo

Luego de haber permanecido todos los explantes en el medio de inducción de callos, distribuidos según los tratamientos, se

pasaron a un medio semi-sólido sin fitohormonas, en la cual permanecieron para la diferenciación de callos y formación de pro-embrioides.

Con todos los tratamientos anteriores se trabajó para la diferenciación de callos y formación de pro-embrioides en segmentos foliares en un medio de cultivo sin fitohormonas (Auxinas y Citoquininas), para ello se preparó un volumen inicial de 1,00 ℓ de solución (1/2 Murashige y Skoog 1962), al cual se le adicionó, 10,00 mg/ℓ Myo-inositol, 0,50 mg/ℓ Pyridoxine, 0,10 mg/ℓ Thiamine, 2,0 mg/ℓ Glycine, 170,00 mg/ℓ NaH_2PO_4 , 2,0 g/ℓ Peptona, 20,00 g/ℓ de sucrosa, 3,75 g/ℓ de Agar – Agar, sin carbón activado, calibrando el pH a 5,3.

Estos fueron dispensados en tubos de ensayo de 25x150 mm a un volumen de 12 ml por tubo de ensayo y luego fueron autoclavados a una presión de 15 lb por 15 minutos a una temperatura de 121 °C; siendo posteriormente llevados a la cámara de flujo laminar para ser envueltos con kling wrap para evitar su contaminación y después enfriados a temperatura ambiente y almacenados en refrigeración a una temperatura de 24 °C.

Transferencia de explantes.

Pasado 45 días que fue el tiempo de inducción de callos de los explantes y teniendo en cuenta la distribución de los tratamientos, se pasaron a un medio semi-sólido sin fitohormonas, para propiciar la diferenciación de callos y formación de pro-embrioides.

Incubación de explantes.

Los explantes fueron incubados a una temperatura promedio de 24 ± 2 °C, H.R: 46%, intensidad luminosa 700 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

4.2.5.4. Tercera etapa: Desarrollo embrionario

Medio de Cultivo

Luego de haber permanecido todos los explantes en el medio de diferenciación de callos y formación de pro-embrioides, distribuidos según los tratamientos, se pasaron a un medio sólido sin fitohormonas, en la cual permanecieron para la formación de embrioides.

Con todos los tratamientos anteriores se trabajó para la formación de embrioides en segmentos foliares en un medio de cultivo sin fitohormonas (Auxinas y Citoquininas), para ello se preparó un volumen inicial de 1,00 l de solución (Murashige y Skoog, 1962), al cual se le adicionó, 10,00 mg/l

Myo-inositol, 0,50 mg/l Pyridoxine, 0,10 mg/l Thiamine, 2,0 mg/l Glycine, 170,00 mg/l NaH_2PO_4 , 2,0 g/l Peptona, 20,00 g/l de sucrosa, 20,00 g/l de maltosa, 3,75 g/l de Agar – Agar, 2,00 g/l carbón activado, calibrando el pH a 5,3.

Estos fueron dispensados en tubos de ensayo de 25*150 mm a un volumen de 12 ml por tubo de ensayo y luego fueron autoclavados a una presión de 15 lb por 15 minutos a una temperatura de 121°C; siendo posteriormente llevados a la cámara de flujo laminar para ser envueltos con kling wrap para evitar su contaminación y después enfriados a temperatura ambiente y almacenados en refrigeración a una temperatura de 24 °C.

Transferencia de explantes.

Pasado 90 días que fue el tiempo de diferenciación pro-embriones y formación de embrioides de los explantes y teniendo en cuenta la distribución de los tratamientos, se pasaron a un medio solido sin fitohormonas con carbón activado, para propiciar la formación de embrioides.

Incubación de explantes.

Los explantes fueron incubados a una temperatura promedio de 24 ± 2 °C, H.R: 46%, intensidad luminosa 700 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

4.2.5.5. Cuarta etapa: Transformación de embrioides

Medio de cultivo

Luego de haber permanecido todos los explantes en el medio de desarrollo embrionario, distribuidos según los tratamientos, se pasaron a un medio basal (MB) en la cual permanecieron para la regeneración de plántulas.

Con todos los tratamientos anteriores se trabajó para la regeneración de plantas de segmentos foliares en un medio de cultivo basal (MB), para ello se preparó un volumen inicial de 1,00 l de solución (**Murashige y Skoog, 1962**), al cual se le adicionó, 0,40 mg/l Thiamine, 0,50 mg/l Acido nicotínico, 20,00 g/l de sucrosa, 3,75 g/l de Agar – Agar, 2,00 g/l carbón activado, calibrando el pH a 5,3.

Estos fueron dispensados en frascos de 15 onzas a un volumen de 50 ml por frasco luego fueron tapados con papel aluminio y cubierto con papel reciclado, autoclavados a una presión de 15 lb por 15 minutos a una temperatura de 121 °C; luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y almacenados en refrigeración a una temperatura de 24 °C.

4.2.5.5. Cuarta etapa: Transformación de embrioides

Medio de cultivo

Luego de haber permanecido todos los explantes en el medio de desarrollo embrionario, distribuidos según los tratamientos, se pasaron a un medio basal (MB) en la cual permanecieron para la regeneración de plántulas.

Con todos los tratamientos anteriores se trabajó para la regeneración de plantas de segmentos foliares en un medio de cultivo basal (MB), para ello se preparó un volumen inicial de 1,00 l de solución (**Murashige y Skoog, 1962**), al cual se le adicionó, 0,40 mg/l Thiamine, 0,50 mg/l Acido nicotínico, 20,00 g/l de sucrosa, 3,75 g/l de Agar – Agar, 2,00 g/l carbón activado, calibrando el pH a 5,3.

Estos fueron dispensados en frascos de 15 onzas a un volumen de 50 ml por frasco luego fueron tapados con papel aluminio y cubierto con papel reciclado, autoclavados a una presión de 15 lb por 15 minutos a una temperatura de 121 °C; luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y almacenados en refrigeración a una temperatura de 24 °C.

Transferencia de explantes.

Pasado 90 días que fue el tiempo de Desarrollo Embrionario de los explantes y teniendo en cuenta la distribución de los tratamientos, se pasaron a un medio sólido con carbón activado, para propiciar la regeneración de plántulas.

Incubación de explantes.

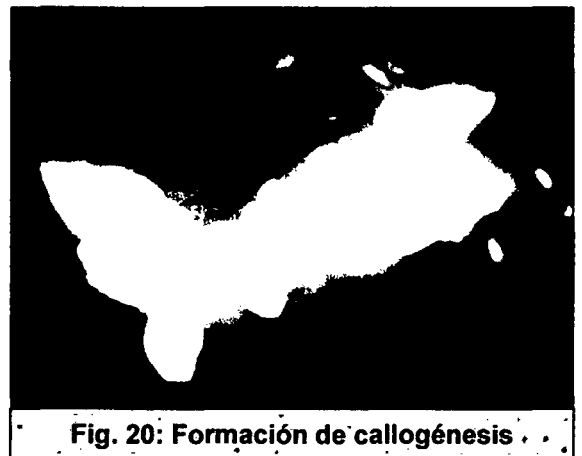
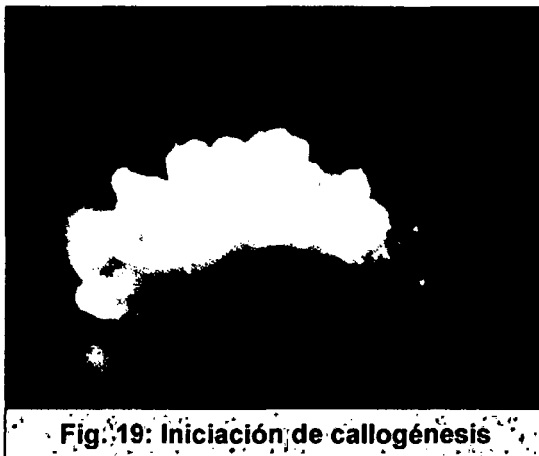
Los explantes fueron incubados a una temperatura promedio de 24°C, H.R: 46%, intensidad luminosa 300 lux y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

4.3. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

- **Porcentaje de callogénesis:** Se realizó tres evaluaciones consecutivas después de 30 días transcurridos (30, 40, 50 días) para cada tratamiento, evaluándose un total de 03 repeticiones por tratamiento.

Formula:

$$\% \text{ Callogénesis} = \frac{\text{Segmentos de hoja inducida}}{\text{Segmentos de hojas totales}} \times 100$$



- **Número de Pro-embrioides:** Se realizó a los 45 días de haberse instalado el ensayo.



- **Numero de Embrioides por explante:** Se realizó a los 90 días de haberse instalado el ensayo.

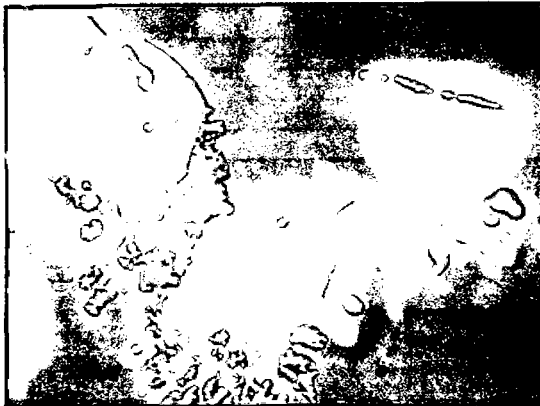


Fig. 23: Formación de embrioides

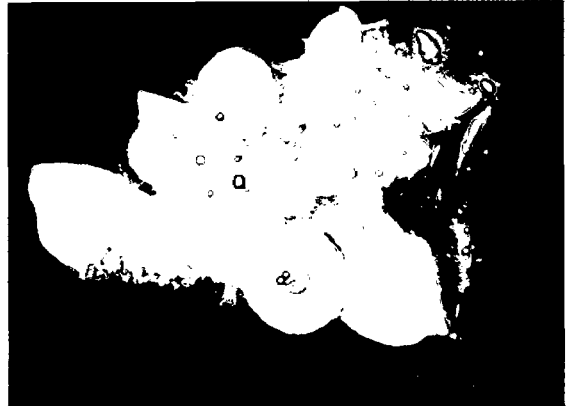


Fig. 24: Diferenciación de embrioides.

- **Número de plántulas regeneradas:** Se evaluó el número total de plantas regeneradas por muestra inducida/tratamiento transcurrido a los 160 días de haberse instalado el ensayo.



Fig. 25: Formación de plántulas



Fig. 26: Plántula regenerada

- **Caracterización de estructuras embriogénicas en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.:** Se caracterizó en forma visual la forma y tipo de estructura embrionaria, utilizando la metodología desarrollada por (Chanatásig, 2004 y Guerrero, 2007).

V. RESULTADOS

5.1. PORCENTAJE DE CALLOGENESIS

a) Porcentaje de callogénesis en la región basal

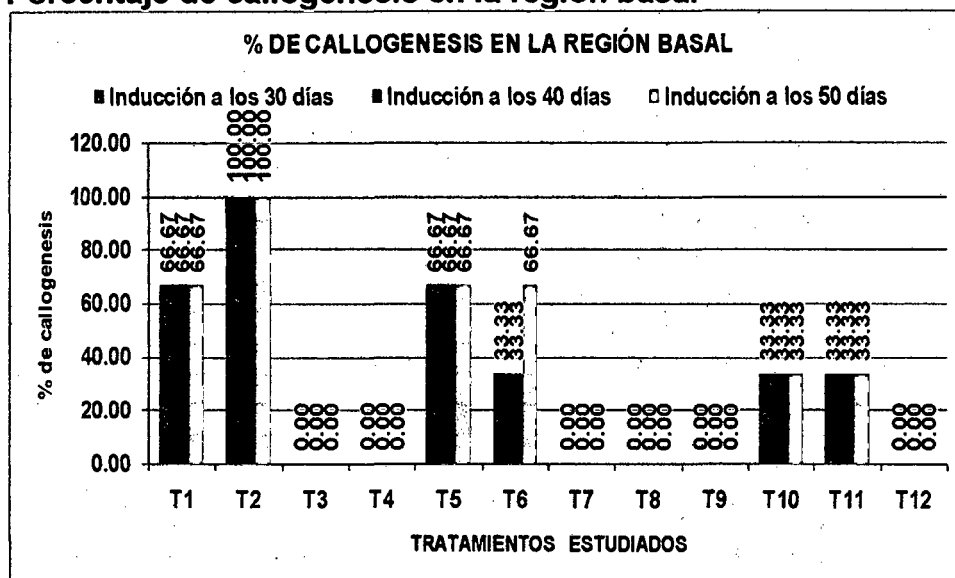


Gráfico 01: Porcentaje de callogénesis en la región basal, evaluado a los (30; 40 y 50) días.

b) Porcentaje de callogénesis en la región media

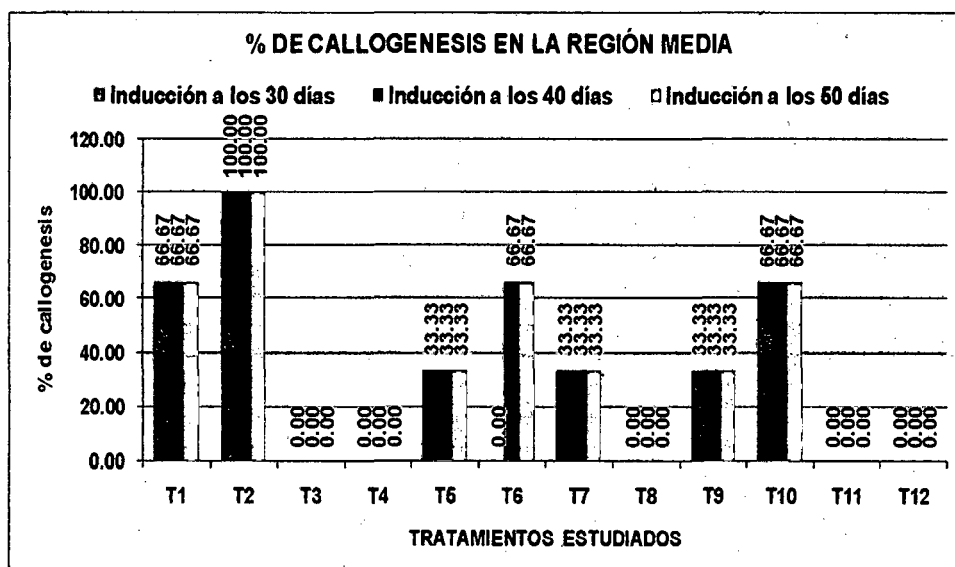


Gráfico 02: Porcentaje de callogénesis en la región media, evaluado a los (30; 40 y 50) días.

c) Porcentaje de callogénesis en la región apical

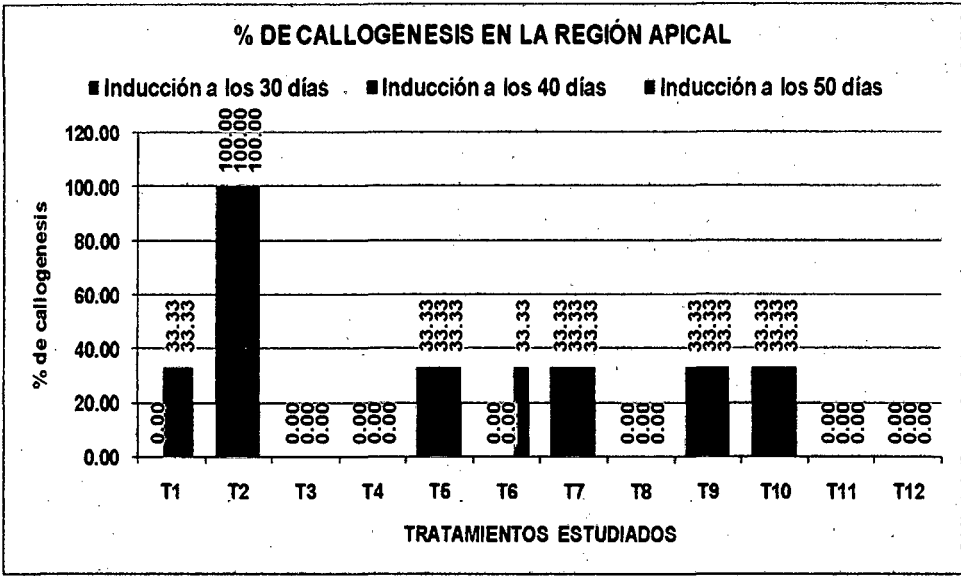


Gráfico 03: Porcentaje de callogénesis en la región apical, evaluado a los (30; 40 y 50) días.

5.2. NÚMERO DE PRO-EMBRIOIDES EN LA REGIÓN BASAL

Cuadro 02: Análisis de varianza para la formación de pro-embrioides a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región basal, evaluado a los 45 días. Datos transformados Arcosen $\sqrt{\%/100}$.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	157,3900	211,1000	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	298,7800	267,1600	(3,00-4,71)	**
Factor A*Factor B	6	176,3900	78,8600	(2,50-3,66)	**
Error	24	8,9500			
Total	35	641,5000			

n.s= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo.

\bar{X} = 2,72 Pro-embrioides R^2 = 99,00 % C.V. = 22,43%

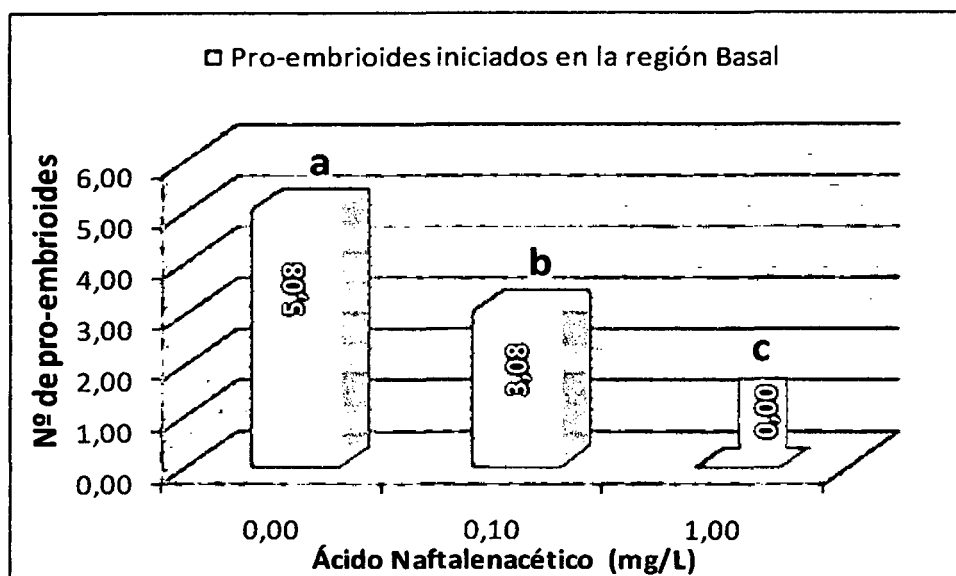


Gráfico 04: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 45 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

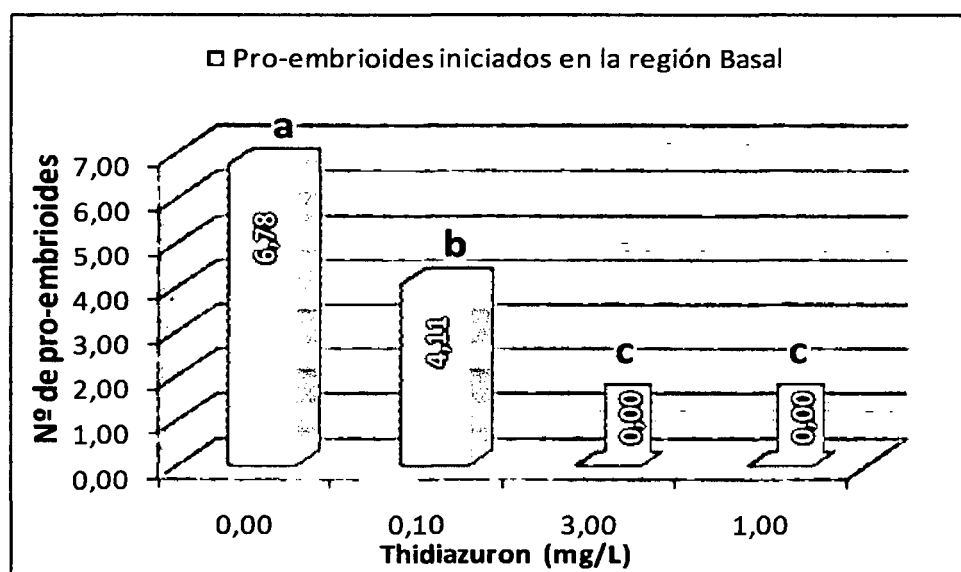


Gráfico 05: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 45 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

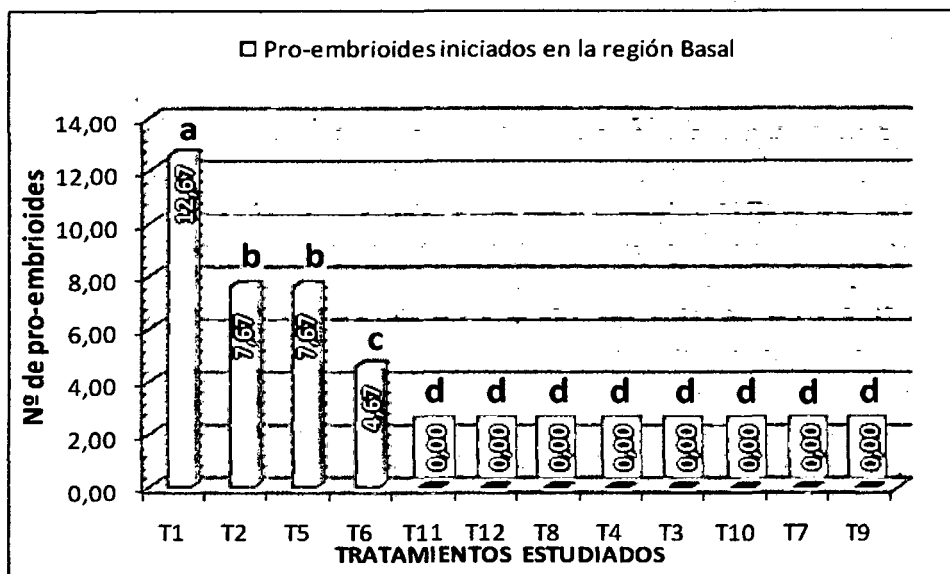


Gráfico 06: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 45 días

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c, d) difieren estadísticamente entre sí.

5.3. NÚMERO DE PRO-EMBRIOIDES EN LA REGIÓN MEDIA

Cuadro 03: Análisis de varianza para la formación de pro-embrioides a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región media, evaluado a los 45 días. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	66,1900	527,0700	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	50,2200	266,6200	(3,00-4,71)	**
Factor A*FactoB	6	100,2800	266,1800	(2,50-3,66)	**
Error	24	1,5100			
Total	35	218,1900			

n.s= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo.

$\bar{X} = 1,00$ Pro-embriode

$R^2 = 99,00 \%$

C.V. = 25,06%

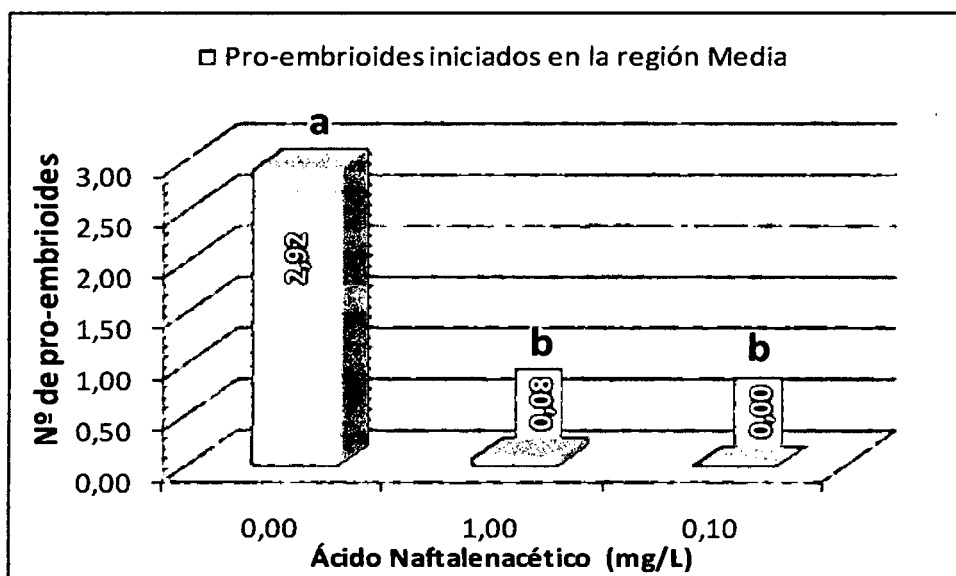


Gráfico 07: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 45 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b) difieren estadísticamente entre sí.

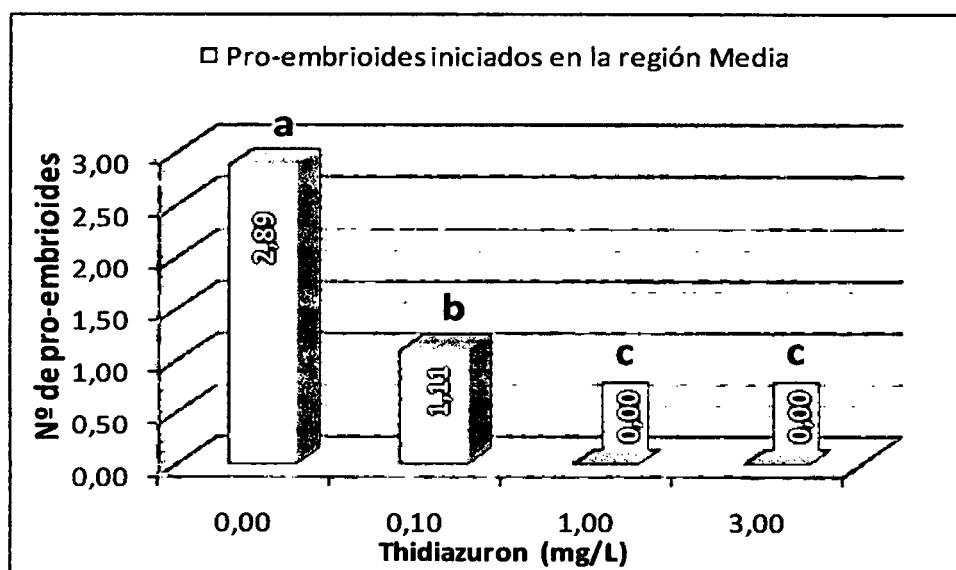


Gráfico 08: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 45 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

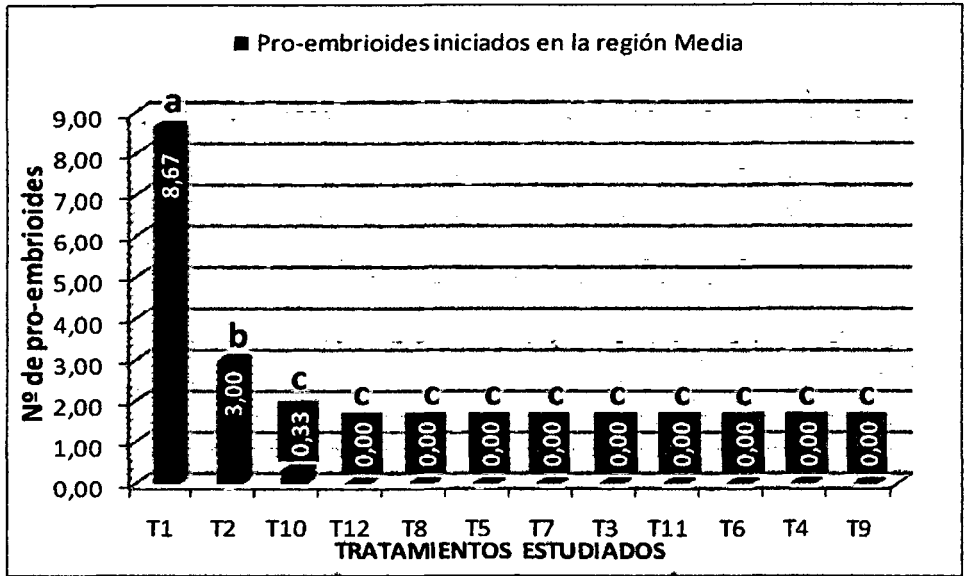


Gráfico 09: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 45 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

5.4. NÚMERO DE PRO-EMBRIOIDES EN LA REGIÓN APICAL

Cuadro 04: Análisis de varianza para la formación de pro-embrioides a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región Apical, evaluado a los 45 días. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	0,7200	157,1900	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	1,1900	173,3200	(3,00-4,71)	**
Factor A*Factor B	6	3,0600	221,6800	(2,50-3,66)	**
Error	24	0,0600			
Total	35	5,0300			

n.s= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo.

$\bar{X} = 0,14$ Pro-embrioides $R^2 = 99,00 \%$ C.V. = 34,51%

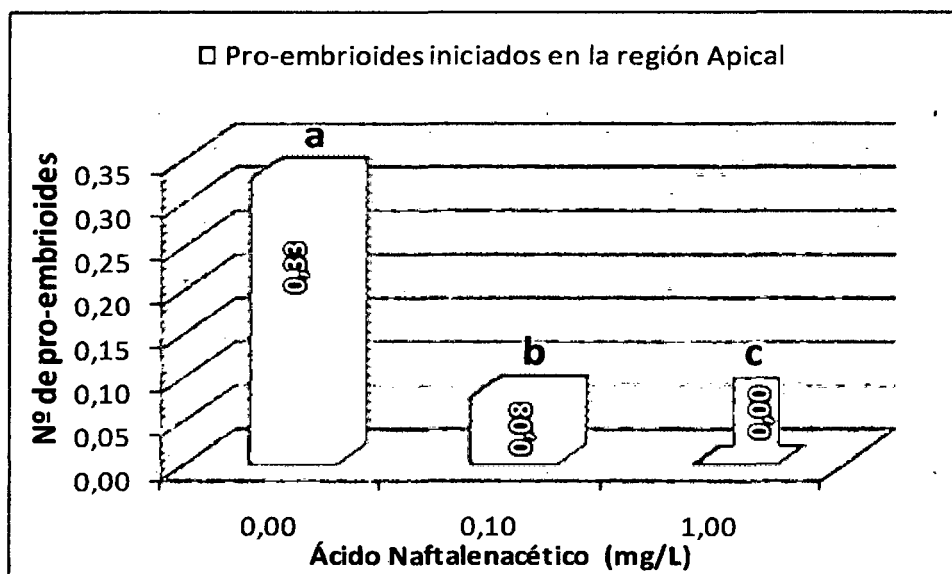


Gráfico 10: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 45 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

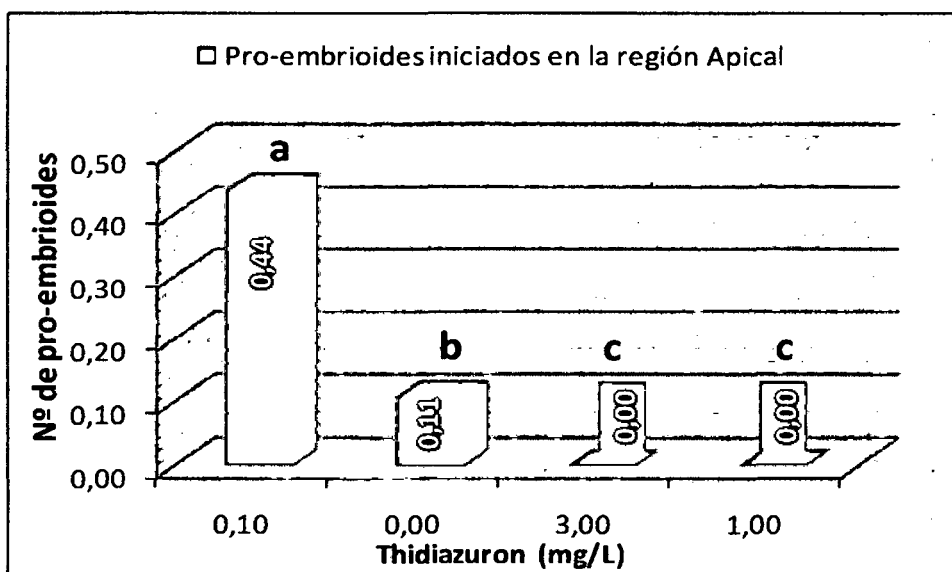


Gráfico 11: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 45 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

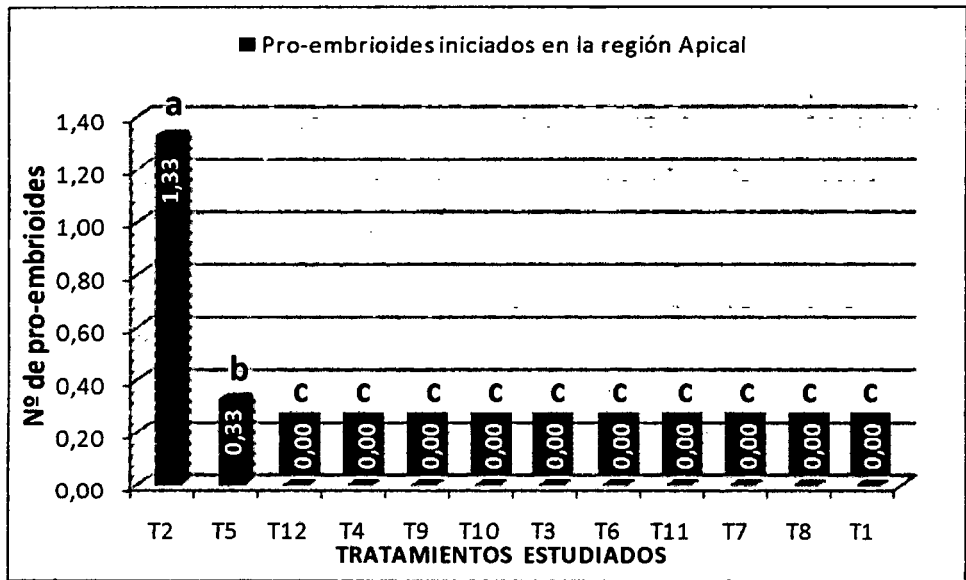


Gráfico 12: Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 45 días.

Prueba de Duncan ($p<0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

5.5. NÚMERO DE EMBRIOIDES EN LA REGIÓN BASAL

Cuadro 05: Análisis de varianza para la formación de embrioides a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región basal, evaluado a los 90 días. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	84.5000	136.7800	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	166.9700	180.1900	(3,00-4,71)	**
Factor A*Factor B	6	125.9400	67.9600	(2,50-3,66)	**
Error	24	7.4100			
Total	35	384.8300			

n.s= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo.

$\bar{X} = 1,92$ Embrioides $R^2 = 98,00 \%$ C.V. = 29,00%

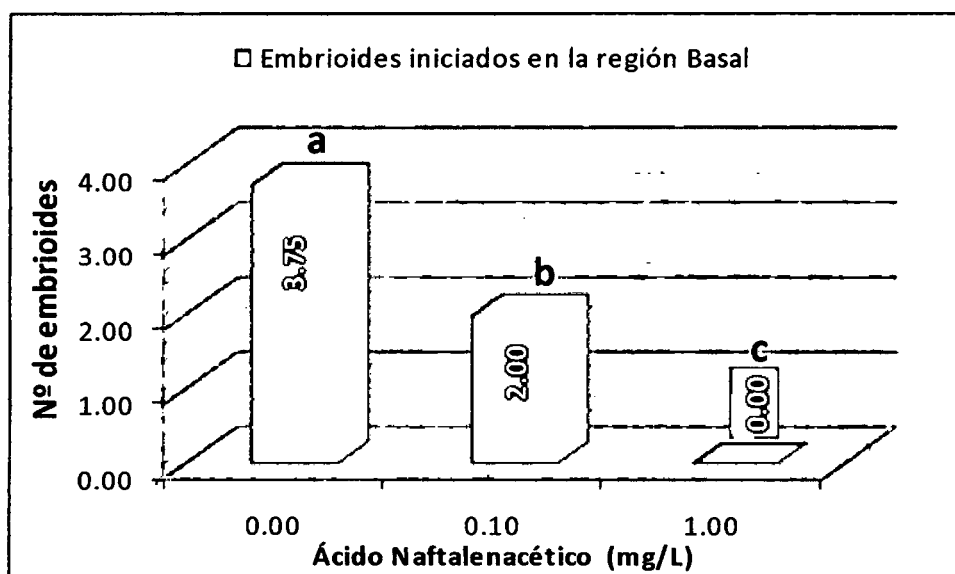


Gráfico 13: Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p<0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

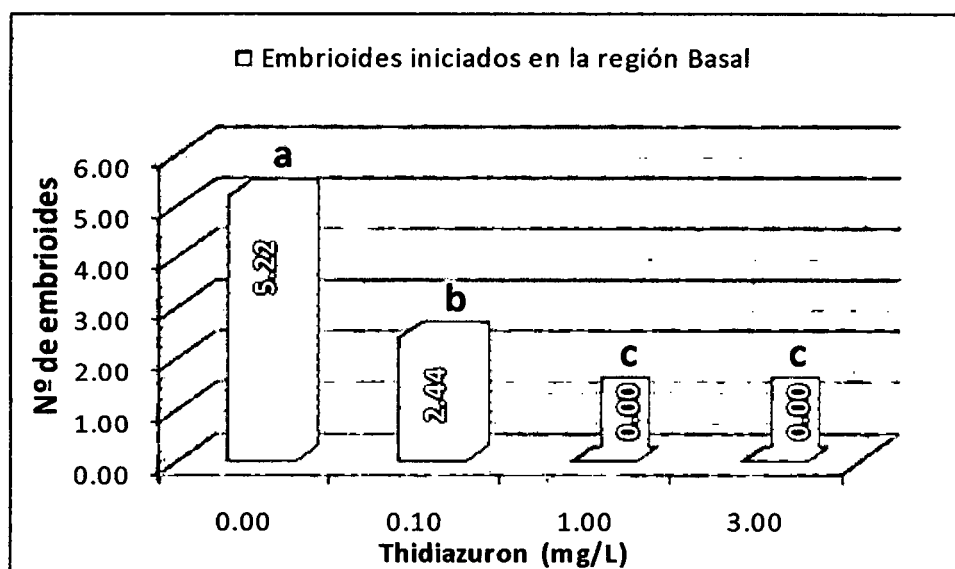


Gráfico 14: Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p<0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

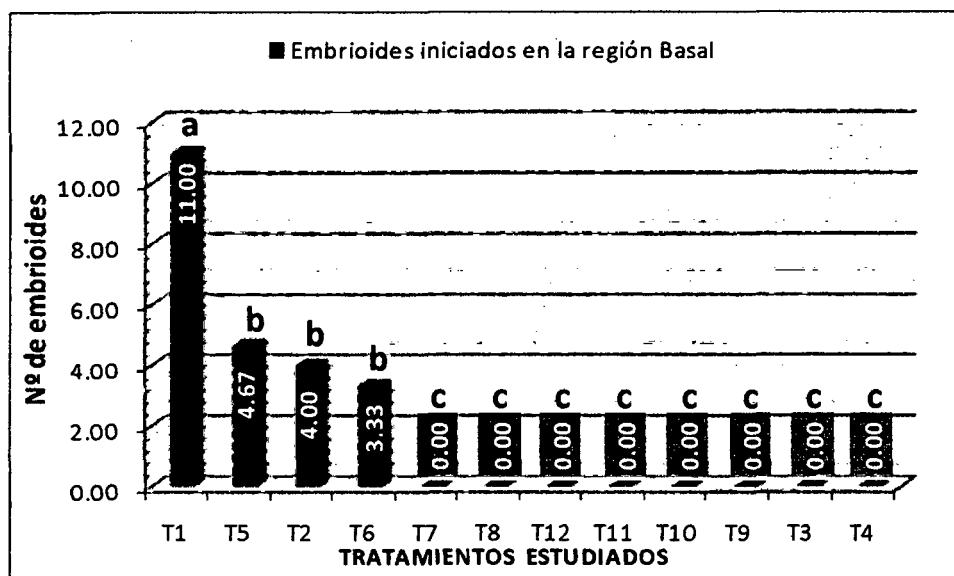


Gráfico 15: Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p<0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

5.6. NÚMERO DE EMBRIOIDES EN LA REGIÓN MEDIA

Cuadro 06: Análisis de varianza para la formación de embrioides a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región media, evaluado a los 90 días. Datos transformados Arcosen $\sqrt{\%/100}$.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	64.2200	324.7200	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	50.1100	168.9100	(3,00-4,71)	**
Factor A*Factor B	6	100.2200	168.9100	(2,50-3,66)	**
Error	24	2.3700			
Total	35	216.9300			

n.s= No significativo

*=Significativo

**= Altamente significativo.

$\bar{X} = 0,95$ Embrioides

$R^2 = 99,00 \%$

C.V. = 33,33%

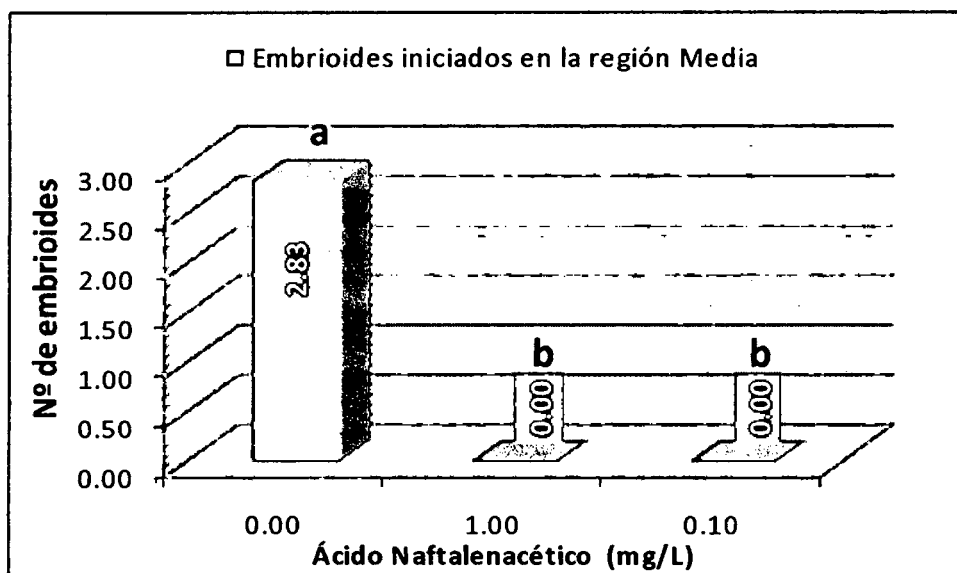


Gráfico 16: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b) difieren estadísticamente entre sí.

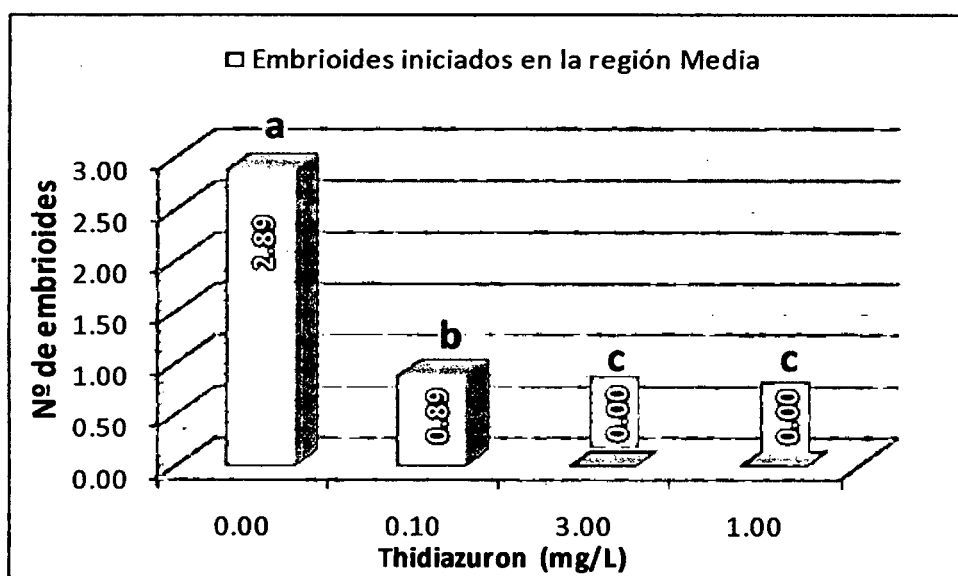


Gráfico 17: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

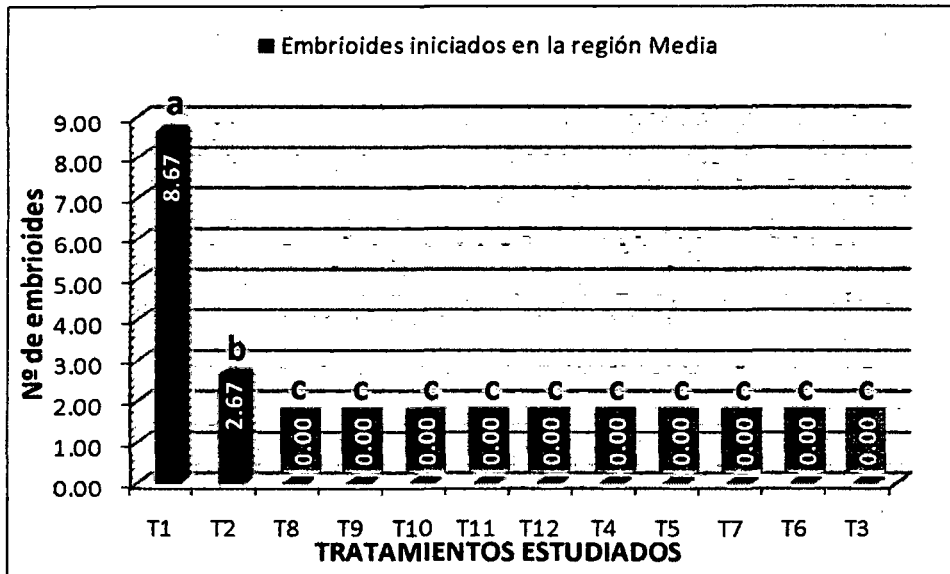


Gráfico 18: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

5.7. NÚMERO DE EMBRIOIDES EN LA REGIÓN APICAL

Cuadro 07: Análisis de varianza para la formación de embrioides a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región apical, evaluado a los 90 días. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\%/100}$.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	0.7200	26.4600	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	1.2000	29.1400	(3,00-4,71)	**
Factor A*Factor B	6	3.0500	37.1900	(2,50-3,66)	**
Error	24	0.3300			
Total	35	5.3000			

n.s= No significativo

*=Significativo

**= Altamente significativo.

$\bar{X} = 0,14$ Embrioides

$R^2 = 94,00 \%$

C.V. = 84,35%

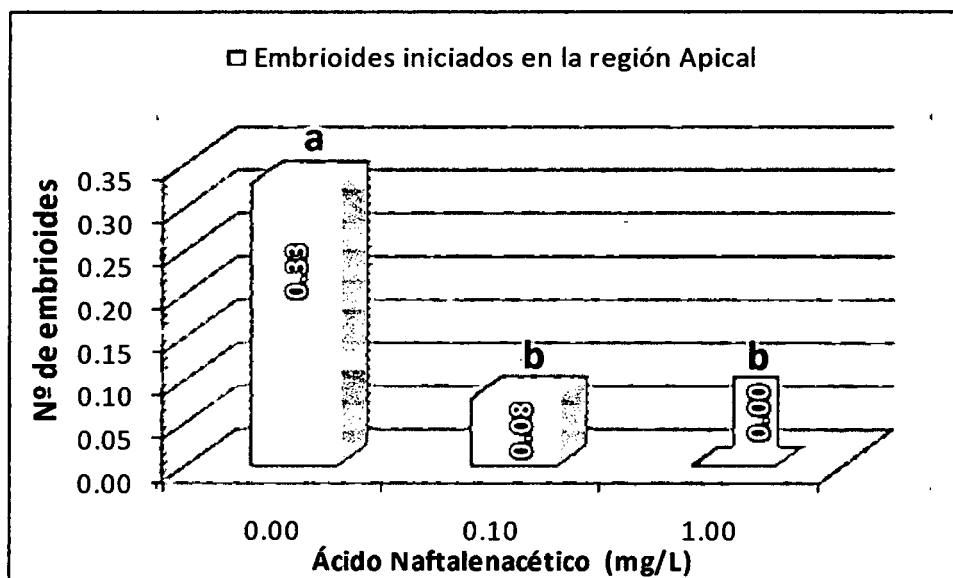


Gráfico 19: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b) difieren estadísticamente entre sí.

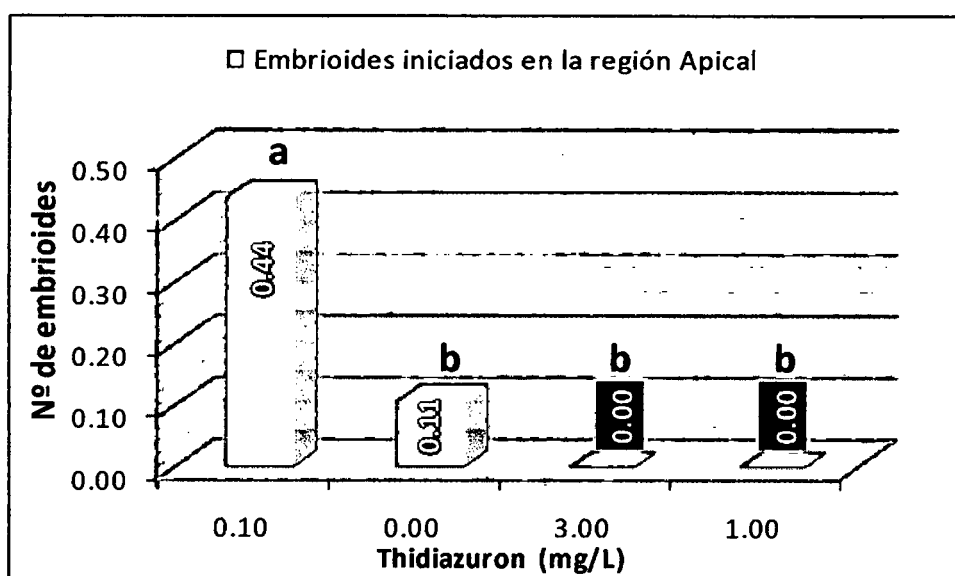


Gráfico 20: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b) difieren estadísticamente entre sí.

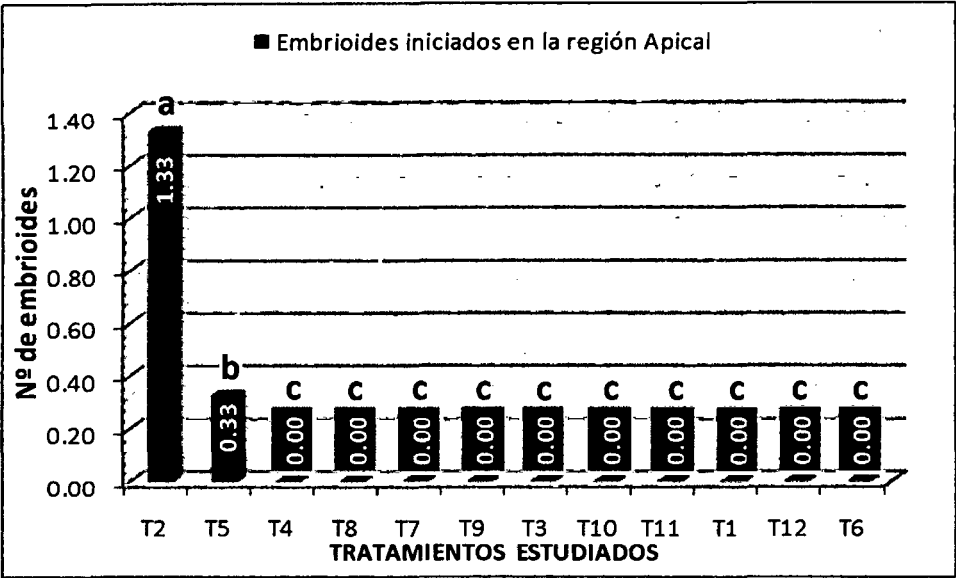


Gráfico 21: Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 90 días.

Prueba de Duncan ($p<0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

5.8. NÚMERO DE PLANTAS REGENERADAS EN LA REGIÓN BASAL

Cuadro 08: Análisis de varianza para la regeneración de plantas a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región basal, evaluado a los 160 días. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\% / 100}$.

F.V.	G.L.	SC	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	22.7200	125.0800	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	28.0800	103.0600	(3,00-4,71)	**
Factor A*Factor B	6	33.5000	61.4700	(2,50-3,66)	**
Error	24	2.1800			
Total	35	86.4900			

n.s= No significativo

*=Significativo

**= Altamente significativo.

$\bar{X} = 0,86$ Plantas regeneradas

$R^2 = 97,00 \%$

C.V. = 35,00%

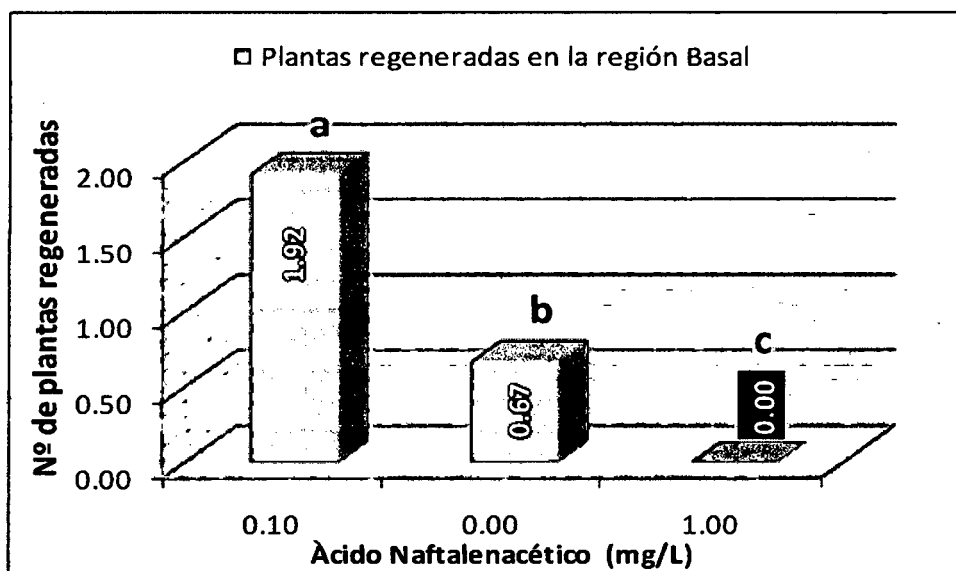


Gráfico 22: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

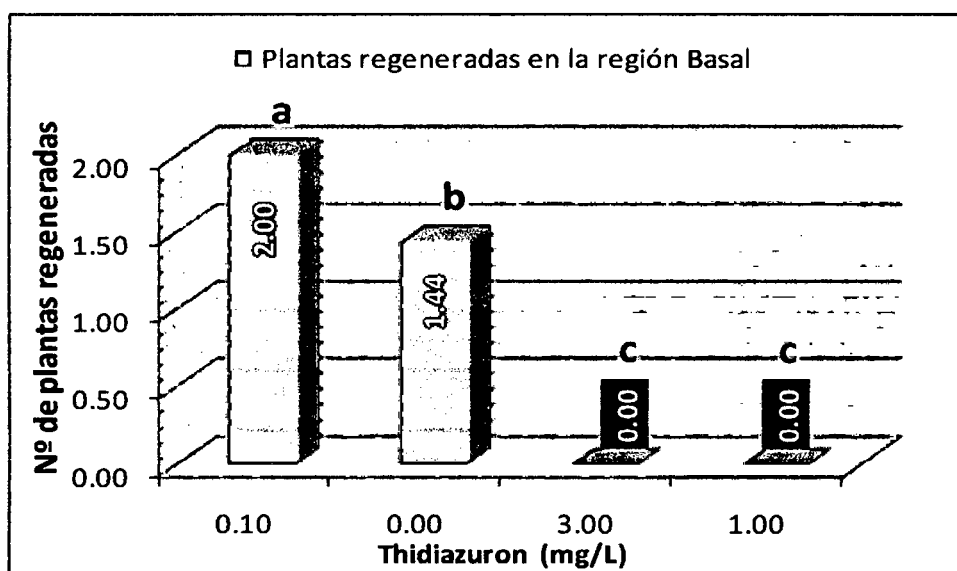


Gráfico 23: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

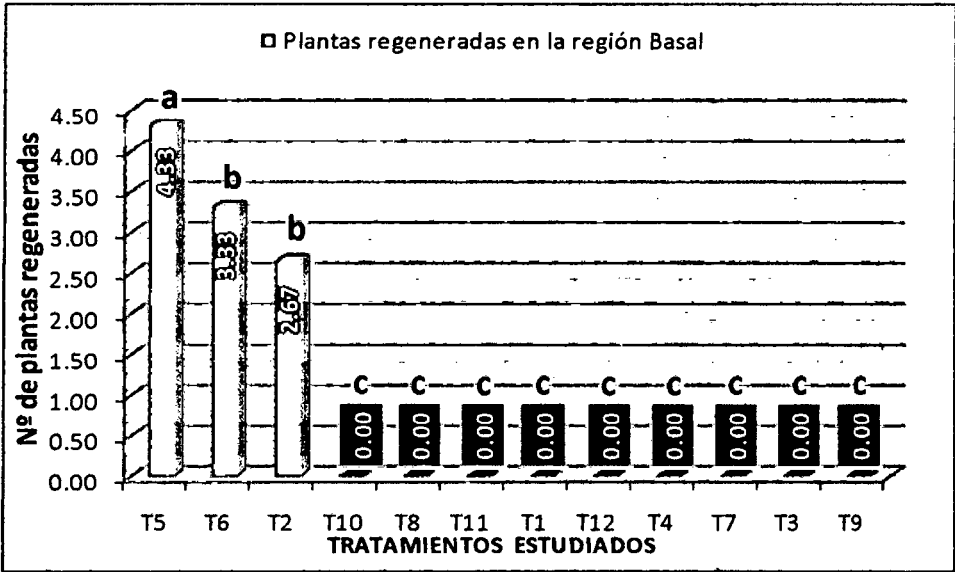


Gráfico 24: Prueba de Duncan ($p<0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p<0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

5.9. NÚMERO DE PLANTAS REGENERADAS EN LA REGIÓN MEDIA

Cuadro 09: Análisis de varianza para la regeneración de plantas a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región media, evaluado a los 160 días. Datos transformados $\text{Arcosen}\sqrt{\%/100}$.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	29.3900	206.6400	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	16.0800	75.3900	(3,00-4,71)	**
Factor A*Factor B	6	32.1700	75.3900	(2,50-3,66)	**
Error	24	1.7100			
Total	35	79.3500			

n.s= No significativo *=Significativo **= Altamente significativo.

$\bar{X} = 0,64$ Plantas regeneradas $R^2 = 98,00 \%$ C.V. = 41,74%

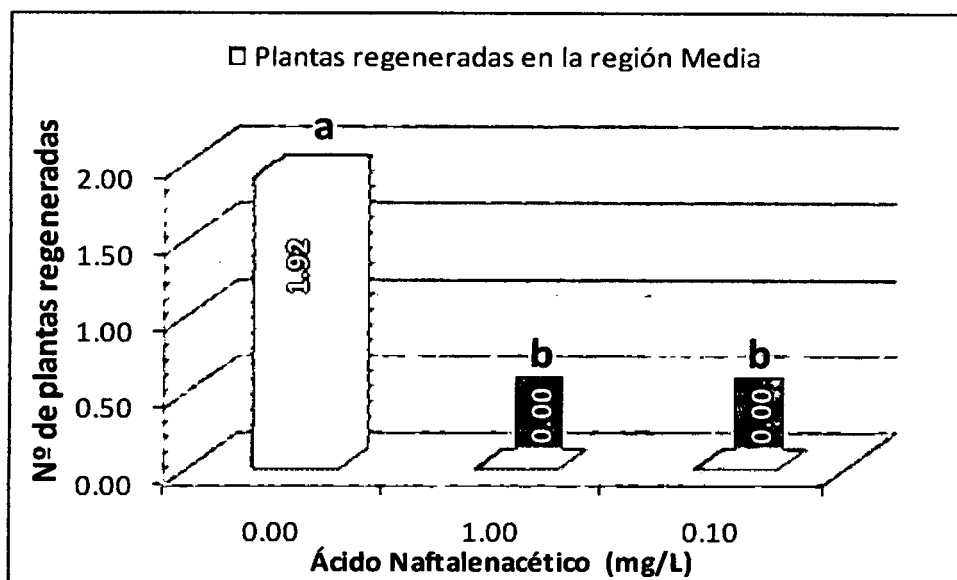


Gráfico 25: Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p<0,01$) letras diferentes (a, b) difieren estadísticamente entre sí.

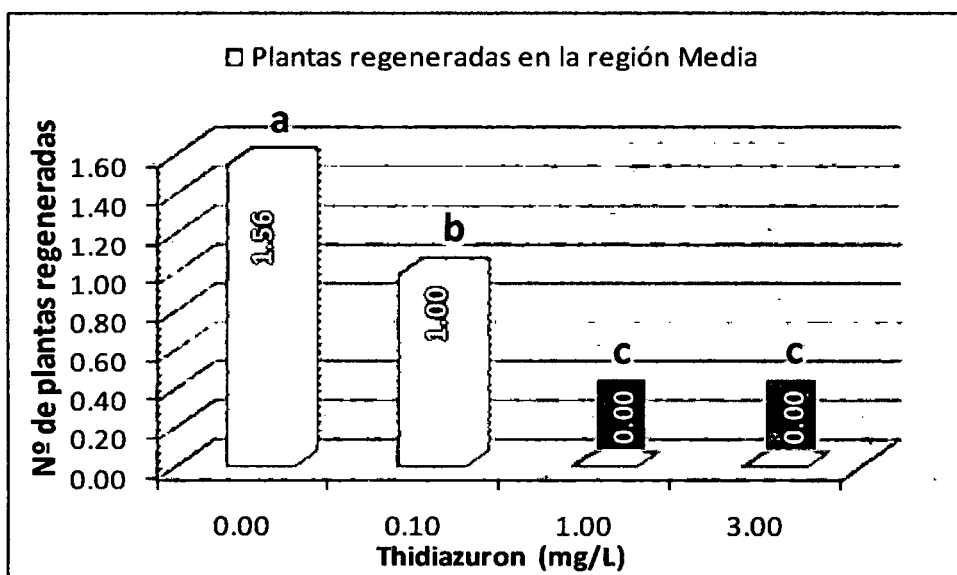


Gráfico 26: Prueba de Duncan ($p<0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p<0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

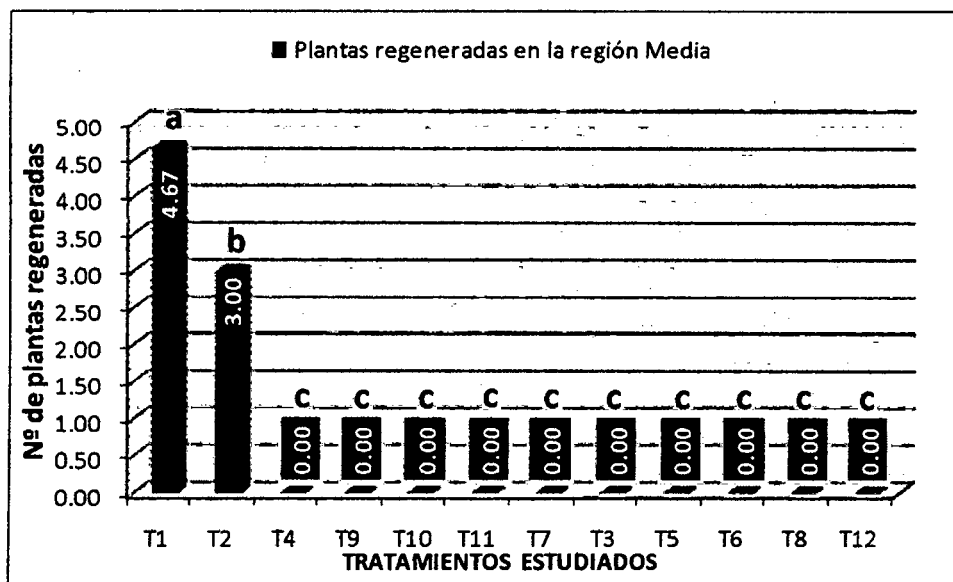


Gráfico 27: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

5.10. NÚMERO DE PLANTAS REGENERADAS EN LA REGIÓN APICAL

Cuadro 10: Análisis de varianza para la regeneración de plantas a partir de segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., en la región apical, evaluada a los 160 días. Datos transformados $\text{Arcosen} \sqrt{\%/100}$.

F.V.	G.L.	S.C.	Fc	Ft(0,05-0,01)	Signf.
Factor A	2	0.0600	57.1400	(3,40- 5,61)	**
Factor B	3	0.0800	57.1400	(3,00-4,71)	**
Factor A*Facto B	6	0.1700	57.1400	(2,50-3,66)	**
Error	24	0.0100			
Total	35	0.3200			

n.s= No significativo

*=Significativo

**= Altamente significativo.

$\bar{X} = 0,03$ Plantas regeneradas

$R^2 = 96,00 \%$

C.V. = 79,37%

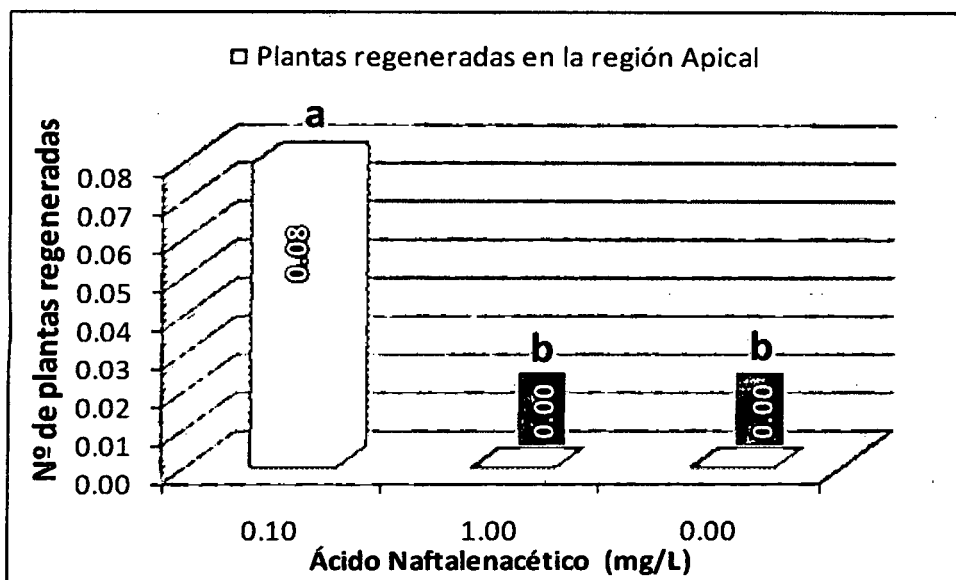


Gráfico 28: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto concentraciones de ácido naftalenacético (A), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b) difieren estadísticamente entre sí.

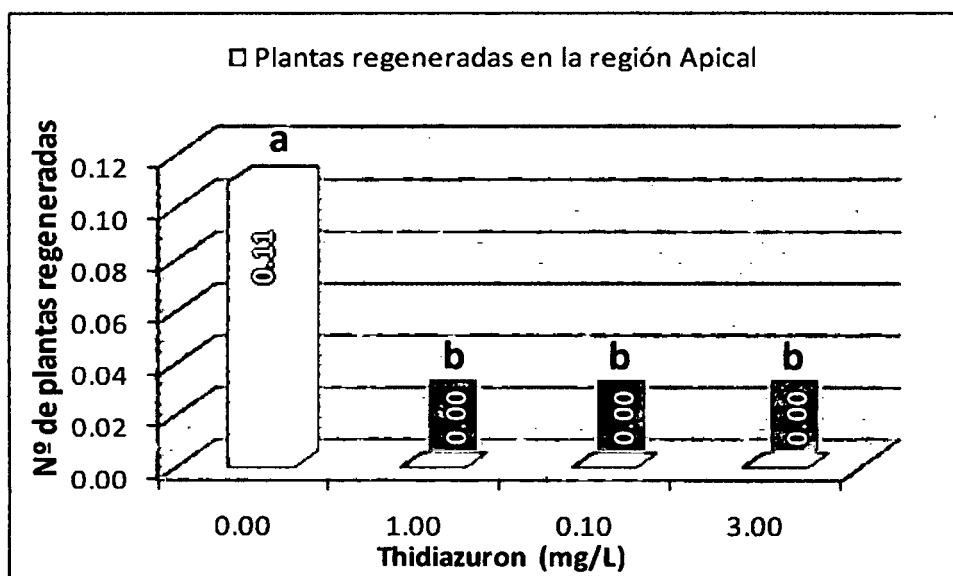


Gráfico 29: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para el efecto principal concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b) difieren estadísticamente entre sí.

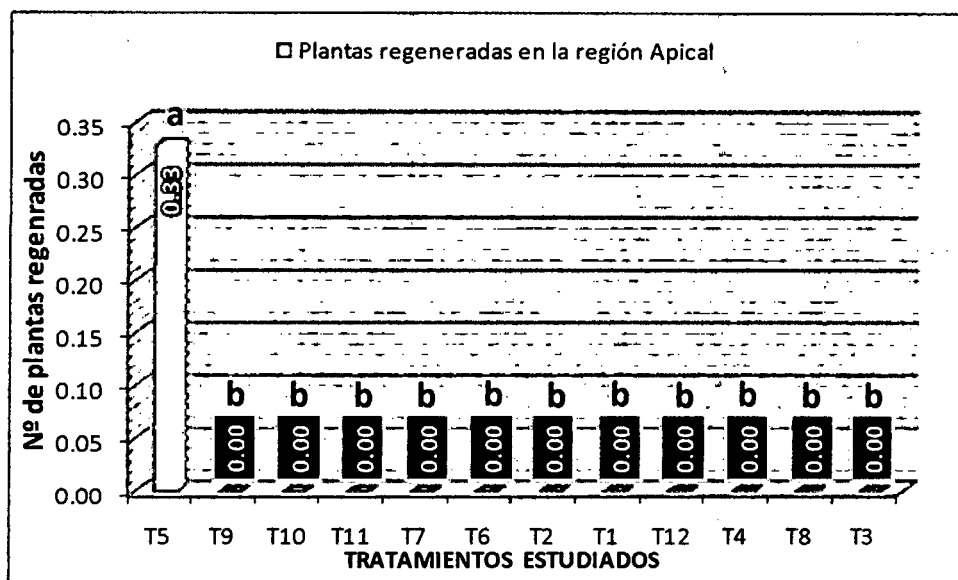


Gráfico 30: Prueba de Duncan ($p < 0,01$) para la interacción ácido naftalenacético (A) y concentración de thidiazurón (B), evaluados a los 160 días.

Prueba de Duncan ($p < 0,01$) letras diferentes (a, b, c) difieren estadísticamente entre sí.

5.11. CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS EN
***Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.**

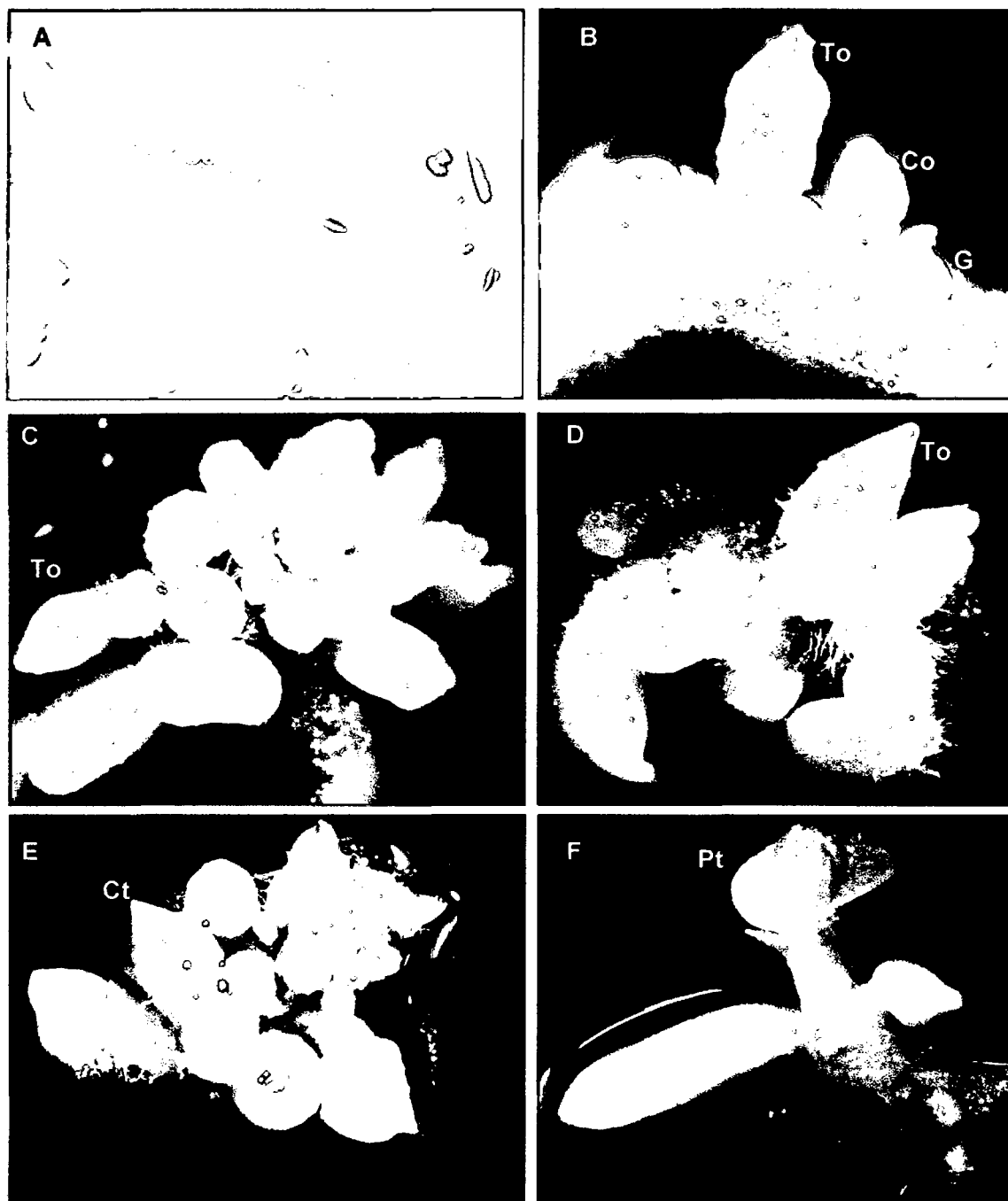


Figura 21. A-F: A (20X). Segmento foliar basal con callo embriogénico (Ce) a los 40 días de inducción; B (30X). Segmento foliar basal a los 45 de inducción con estructuras embriogénicas en estadio globular (G), acorazonado (Co) y torpedo (To); C (30X). Estructuras en estadio torpedo (To), tornándose al estadio Torpedo (To); D (30X). Estructuras en estadio Torpedo (To). E (30X) Estructuras embriogénicas en forma de cotiledón (Ct) a los 90 de inducción. F (30X): Transformación de plantas (Pt) a los 160 días de inducción.

VI. DISCUSIONES

6.1. PORCENTAJE DE CALLOGÉNESIS

El estudio realizado para el porcentaje de callogénesis, en el tratamiento T₂ (0,00 mg/l ANA; 0,10 mg/l TDZ) reportó un 100% de inducción de callos a los 30, 40 y 50 días. En las regiones basal, media y apical (Ver gráfico 01; 02 y 03), resultados consecuentes a los obtenidos por (Chen y chang, 2006), quien obtuvo un 93,8 % de inducción de callos con un medio de cultivo suplementado con vitaminas y fitohormonas de (0,00 mg/l ANA y 3,00 mg/l TDZ) a partir de segmentos foliares enteros (hojas de 1,0 cm) a los 20 días de cultivo de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

Para los demás tratamientos T₁, T₅, T₆, T₁₀, y T₁₁ del segmento foliar de la región basal obtuvieron un 66.67%, 66.67%, 33.33%, 33.33% y 33.33% de formación de callos respectivamente a los 30 días de cultivo, excepto a los demás tratamientos T₃, T₄, T₇, T₈, T₉ y T₁₂, que no lograron inducir callos, esto se debe a la fenolización de los explantes (Ver gráfico 01).

También los tratamientos T₁, T₅, T₆, T₇, T₉ y T₁₀, del segmento foliar de la región media obtuvieron 66.67%, 33.33%, 33.33%, 33.33% y 66.67% de formación de callos respectivamente a los 30 días de cultivo, excepto a los demás tratamientos T₃, T₄, T₈, T₁₁ y T₁₂, que no prosperaron en la inducción de callos debido a la fenolización (Ver gráfico 02).

De igual manera los tratamientos T₅, T₇, T₉ y T₁₀, del segmento foliar de la región apical obtuvieron 33.33%, 33.33%, 33.33% y 33.33%, en la formación de

callos respectivamente a los 30 días de cultivo, excepto a los demás tratamientos T_1 , T_3 , T_4 , T_6 , T_8 , T_{11} y T_{12} , que no lograron inducir callos, esto se debe a la fenolización de los explantes (**Ver gráfico 03**).

Por tanto para el segmento foliar de la región basal, el tratamiento $T_6= 66, 67\%$ logró un incremento a los 50 días (**Ver gráfico 01**), de igual manera para el segmento foliar de la región media el tratamiento $T_6= 66, 67\%$ logró inducir callos a los 40 días (**Ver gráfico 02**), así mismo el segmento foliar de la región apical el tratamiento $T_1= 33,33\%$ logró inducir a los 40 días y el $T_6= 33, 33\%$ a los 50 días (**Ver gráfico 03**). Esto debido a los fenoles que segrega el explante lo cual no lo permite con el desarrollo homogéneo.

6.2. NUMERO DE PRO-EMBRIOIDES POR EXPLANTE

6.2.1. Región Basal

El análisis de varianza (**Cuadro 02**), para el número de Pro-embrioides obtenidos en los tratamientos (T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 , T_8 , T_9 , T_{10} , T_{11} y T_{12}), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para las diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B), aceptándose por tanto que el desarrollo de pro-embrioides en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., depende entre otras condiciones, del tipo de explante y la dosis de ANA y TDZ aplicado. Se obtuvo una media de 2,72 Pro-embrioides; con un coeficiente de variabilidad de 22,43% y un coeficiente de determinación de 99,00% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (**Calzada, 1982**), lo que se demuestra la eficiencia en

la conducción del trabajo, el alto valor del coeficiente de variabilidad se debe a las diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B).

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal sobre las concentraciones del ácido naftalenacético (A) (**Gráfico 04**), muestra que existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA (A), demostrándose que los tratamientos exentos de ANA, obtuvo la mejor respuesta con 5,08 pro-embrioides, seguido por aquellos tratamientos que fueron tratados con 0,1 mg/l de ANA que lograron obtener 3,08 pro-embrioides; no destacándose la presencia de pro-embrioides en aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 1,0 mg/l de ANA, la respuesta morfogénica presente en segmentos foliares, lo cual responden favorablemente en ausencia de ácido naftalenacético y thidiazurón . (**Gráfico 05**), asimismo para el efecto principal dosis de thidiazurón (B), las respuestas son favorables en ausencia de la citoquinina (0,0 mg/l) con 6,78 pro-embrioides, y su incremento disminuye progresivamente la oportunidad para generar pro-embrioides tal como sucede para el caso anterior, del estudio de los efectos principales posiblemente se otorgue a la capacidad de formar pro-embrioides del tejido inmaduro sinteticen fitohormonas en pequeñas cantidades suficientes para la expresión morfogénica y su incremento de auxinas y citoquininas pueden alterar las concentraciones iniciales presentes en el tejido (Taiz y Zeiger, 2004).

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de pro-embrioides (**Gráfico 06**), demuestra una vez más que el tratamiento (T₁) exento de auxina (ANA) y citoquinina (TDZ), obtiene una mejor respuesta en la génesis de pro-embrioides con un total de 12,67 pro-embrioides/explante, seguido de los tratamientos (T₂, T₅, T₆) con 7,67; 7,67; 4,67 pro-embrioides respectivamente, tratamientos que fueron enriquecidos con mínimas concentraciones de fitohormonas; por otra parte vista la eventualidad de los efectos principales y de la interacción, la generación de pro-embrioides en segmentos de la región basal de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., no tiene dependencia de reguladores de crecimiento, tan solo es suficiente la adición de componentes minerales del medio de cultivo y las mínimas concentraciones de fitohormonas que posiblemente se sinteticen en la región del mismo explante (**Taiz y Zeiger, 2004**).

Los tratamientos T₁₁; T₁₂; T₈; T₄; T₃; T₁₀; T₇; T₉; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo cual los segmentos foliares en la región basal no responden a elevadas concentraciones de auxinas (ANA) y citoquininas (TDZ) por que aceleran la fenolización y/o inhiben el proceso fisiológico del explante (**Hurtado y Merino, 1994**), menciona que los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas, los cuales son producidos en una parte de ella y transferidos a otras, en la cual influyen un proceso específico.

6.2.2. Región Media

El análisis de varianza (**Cuadro 03**), para el número de pro-embrioides obtenidos en los tratamientos (T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 , T_8 , T_9 , T_{10} , T_{11} y T_{12}), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para las diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B), aceptándose por tanto que el desarrollo de pro-embrioides en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., se inclinan, entre otras condiciones, del tipo de explante y la dosis de ANA y TDZ aplicado. Se obtuvo una media de 1,00 Pro-embrioides; con un coeficiente de variabilidad de 25,06% y un coeficiente de determinación de 99,00% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (**Calzada, 1982**).

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal de las concentraciones del ácido naftalenacético (A) (**Gráfico 07**), muestra que existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA demostrándose que los tratamientos exento de ANA, obtuvo la mejor respuesta con 2,92 pro-embrioides, seguido por aquellos tratamientos que contenían 1,00 mg/l ANA, logrando obtener 0,08 pro-embrioides, no destacándose la presencia de pro-embrioides en aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 0,10 mg/l de ANA, la respuesta a concentraciones mínimas auxinas que transporta el explante de segmentos foliares de *phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., de la región Media, responden favorablemente en ausencia de ácido naftalenacético y thidiazurón. (**Gráfico 08**), de igual forma para el efecto principal dosis de

thidiazurón (B), las respuestas son favorables en ausencia de citoquinina (0,0 mg/l) con 2,89 pro-embrioides, y su aumento disminuye gradualmente la oportunidad para generar pro-embrioides, de igual manera sucede para el caso anterior del estudio de los efectos principales, posiblemente se otorgue a la capacidad del tejido inmaduro de segmentos foliares en la región media de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., donde sintetizan fitohormonas citoquininas (TDZ) en pequeñas cantidades suficientes para la formación de pro-embrioides y que su incremento de auxinas y citoquininas pueda alterar las concentraciones iniciales presentes en el tejido (Taiz y Zeiger, 2004).

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de pro-embrioides (Gráfico 09), demuestra una vez más que el tratamiento (T₁) exento de auxina (ANA) y citoquinina (TDZ), obtiene una mejor respuesta en la génesis de pro-embrioides con un total de 8,67 pro-embrioides en la región media, seguido del tratamiento T₂ y T₁₀; con promedios de 3,00; 0,33 pro-embrioides respectivamente, tratamientos que fueron enriquecidos con mínimas concentraciones de fitohormonas; por otra parte vista la eventualidad de los efectos principales y la interacción. La generación de pro-embrioides en segmentos de la región media de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., no tiene dependencia de reguladores de crecimiento, tan solo es suficiente la adición de componentes minerales del medio de cultivo y las mínimas concentraciones de fitohormonas que posiblemente se sinteticen en la región media (Taiz y Zeiger, 2004).

Los tratamientos T₁₂; T₈; T₅; T₇; T₃; T₁₁; T₆; T₄; T₉; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo tanto los segmentos foliares en la región media no responden a elevadas concentraciones de auxinas (ANA) y citoquininas (TDZ) por que aceleran la fenolización y/o inhiben el proceso fisiológico del explante **Skoog y Miller, (1957)**, mencionan que el proceso de crecimiento y diferenciación en cultivo de tejidos es dramáticamente afectado por la interacción auxina-citoquinina, habiendo sido ampliamente aceptado que las plantas regulan los niveles de auxinas y citoquininas por el proceso de síntesis y conjugación.

6.2.3. Región Apical

El análisis de varianza (**Cuadro 04**), para el número de pro-embrioides obtenidos en los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₉, T₁₀, T₁₁ y T₁₂), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B), aceptándose por tanto que el desarrollo de pro-embrioides en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., dependen, entre otras condiciones, del tipo de explante y la dosis de ANA y TDZ aplicado. Se obtuvo una media de 0,14 Pro-embrioides; con un coeficiente de variabilidad de 34,51% y un coeficiente de determinación de 99,00% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (**Calzada, 1982**).

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal sobre las concentraciones del ácido naftalenacético (A) (**Gráfico 10**), muestra que

existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA, demostrándose que los tratamientos libres de ANA, obtuvo la mejor respuesta con 0,33 pro-embrioides, seguido por aquellos tratamientos que fueron tratados con 0,10 mg/l de ANA que lograron obtener 0,08 pro-embrioides, no destacándose la presencia de pro-embrioides en aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 1,00 mg/l ANA, la respuesta a la formación de pro-embrioides presente en segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., de la región apical, responden favorablemente en ausencia de ácido naftalenacético y thidiazurón. **(Gráfico 11)**, por lo cual para el efecto principal dosis de thidiazurón (B), las respuestas son favorables en presencia de la citoquinina (0,10 mg/l TDZ) con 0,44 pro-embrioides con respecto a la siguiente dosis que no contenían citoquinina logrando respuestas favorables (0,00 mg/l) con 0,11 pro-embrioides, por lo que el incremento citoquina disminuye progresivamente la oportunidad para generar pro-embrioides tal como sucede para el caso anterior, del estudio de los efectos principales posiblemente se otorgue a la capacidad del tejido inmaduro de segmentos foliares apicales de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., **(Ernst, 1994)**, logró obtener brotes en un rango inferior (0,23-1,14 mg/l).

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de pro-embrioides **(Gráfico 12)**, demuestra que el tratamiento (T₂) exento de auxina y mínimas concentraciones de citoquininas obtiene una mejor respuesta en el origen de pro-embrioides con un total 1,33 pro-embrioides en la región

apical, seguido del tratamiento T₅, con promedio de 0,33 pro-embrioides. Este mayor número de pro-embrioides se debe probablemente que el medio de cultivo usado esté libre de auxinas con la interacción de la citoquinina en mínimas concentraciones por lo cual hay un equilibrio entre los procesos fisiológicos y de respiración del explante, provocando la formación y desarrollo de pro-embrioides (**Delgado y Rojas, 1999**).

Los tratamientos T₁₂; T₄; T₉; T₁₀; T₃; T₆; T₁₁; T₇; T₈; T₁; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo cual los segmentos foliares en la región apical no responden a elevadas concentraciones de Acido naftalenacético y TDZ por que aceleran la fenolización y/o inhiben el proceso fisiológico del explante (**Hurtado y Merino, 1994**), menciona que los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas, los cuales son producidos en una parte de ella y transferidos a otras, en la cual influyen un proceso específico.

6.3. NÚMERO DE EMBRIOIDES POR EXPLANTE

6.3.1. Región Basal

El análisis de varianza (**Cuadro 05**), para el número de embrioides obtenidos en los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₉, T₁₀, T₁₁ y T₁₂), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas donde se obtuvo una media de 1,92 embrioides; con un coeficiente de variabilidad de 29,00% y un coeficiente de determinación

de 98,00%, resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (Calzada, 1982), el alto nivel de coeficiente de variabilidad se debe a las diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B), aceptándose por tanto que el desarrollo de embrioides en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., dependen, entre otras condiciones, del tipo de explante y la dosis de ANA y TDZ aplicado.

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal sobre las concentraciones del Acido naftalenacético (A) (**Gráfico 13**), muestra que existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA demostrándose que los tratamientos libres de ANA, obtuvo la mejor respuesta con 3,75 embrioides, seguido por aquellos tratamientos que fueron tratados con 0,10 mg/l ANA que lograron obtener 2,00 embrioides, no destacándose la presencia de embrioides en aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 1,00 mg/l ANA, la respuesta a la formación de embrioides en segmentos foliares de *phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., de la región Basal, responden favorablemente en ausencia de ácido naftalenacético y thidiazurón (**Gráfico 14**), tal es el caso que para el efecto principal dosis de thidiazurón (B) las respuestas son favorables en ausencia de la citoquinina (0,0 mg/l) con 5,22 embrioides, no destacándose el mayor numero de embrioides en aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 0,10 mg/l TDZ que lograron obtener 2,44 embrioides, y su incremento disminuye progresivamente la oportunidad para generar embrioides. Tal como

sucede en los demás tratamientos que no obtienen formación de embrioides. La presencia de una auxina, resultaba crítica para la iniciación de la embriogénesis y la baja concentración de auxina o su total ausencia favorecerá la maduración de los embrioides (**Halperin, 1966**)

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de embrioides (**Gráfico 15**), demuestra una vez más que el tratamiento (T₁) exento de auxina (ANA) y citoquinina (TDZ), obtiene una mejor respuesta en la génesis de embrioides con un total 11,00 embrioides en la región basal, seguido de los tratamiento (T₅; T₂; T₆) con 4,67; 4,00; 3,33 embrioides respectivamente tratamientos que fueron enriquecidos con mínimas concentraciones de fitohormonas; por otra parte vista la eventualidad de los efectos principales y de la interacción, la generación de embrioides en segmentos de la región basal de *phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., no depende de reguladores de crecimiento, tan solo es suficiente la adición de componentes minerales del medio de cultivo y las mínimas concentraciones de fitohormonas que posiblemente se sinteticen en la región basal Esta fase es la que muestra el desarrollo normal del embrión somático, destacado por la secuencia de cambios morfológicos: globular, acorazonado y torpedo, sin embargo es posible observar otras formas complementarias como la de torpedo tardío, cotiledonal y torpedo expandido como ocurre en la embriogénesis somática del camote (**Chée y Cantliffe, 1989; Delgado, 1995**).

Los tratamientos T₇; T₈; T₁₂; T₁₁; T₁₀; T₉; T₃; T₄; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo cual los segmentos foliares en la región basal no responden a elevadas concentraciones de Auxina (ANA) y citoquinina (TDZ) por que aceleran la fenolización y/o inhiben el proceso fisiológico del explante (Chen y Chang, 2006).

6.3.2. Región Media

El análisis de varianza (**Cuadro 06**), para el número de embrioides obtenidos en los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₉, T₁₀, T₁₁ y T₁₂), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B). Se obtuvo una media de 0,95 embrioides; con un coeficiente de variabilidad de 33,33% y un coeficiente de determinación de 99,00% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (Calzada, 1982).

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal sobre las concentraciones del Acido naftalenacético (A) (**Gráfico 16**), muestra que existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA demostrándose que los tratamientos libres de ANA, obtuvo la mejor respuesta con 2,83 embrioides, seguido por aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 1,00 y 0,10 mg/l ANA donde no obtuvieron formación de embrioides esto se debe que al incrementar la dosis de auxinas fenolizan y/o inhiben el desarrollo de los segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., de la región media, el mayor número de

embrioides que se obtuvieron responden favorablemente en ausencia de ácido naftalenacético y thidiazurón. (**Gráfico 17**), tal es el caso que para el efecto principal dosis de thidiazurón (B) las respuestas son favorables en ausencia de la citoquinina (0,0 mg/l) con 2,89 embrioides, destacándose la presencia de un promedio mínimo de embrioides en aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 0,10 mg/l TDZ que lograron obtener 0,89 embrioides, y su incremento disminuye progresivamente la oportunidad para generar embrioides. Tal como sucede en los demás tratamientos que no obtienen formación de embrioides, la presencia de una auxina, resultaba crítica para la iniciación de la embriogénesis y la baja concentración de auxina o su total ausencia favorecerá la maduración de los embrioides (**Halperin, 1966**).

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de embrioides (**Gráfico 18**), demuestra una vez más que el tratamiento (T₁) exento de auxina (ANA) y citoquinina (TDZ), obtiene una mejor respuesta en la génesis de embrioides con un total 8,67 embrioides en la región media, seguido del tratamiento (T₂= 0,00 mg/l ANA y 0,10 mg/l TDZ) con 2,67 embrioides en la región media, los tratamientos que fueron enriquecidos con mínimas concentraciones de fitohormonas (auxinas y citoquininas); por otra parte vista la eventualidad de los efectos principales y de la interacción, la generación de embrioides en segmentos de la región media de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., no dependen de reguladores de

crecimiento, tan solo es suficiente la adición de componentes minerales del medio de cultivo y las mínimas concentraciones de fitohormonas que se sintetizan en la región media, esta fase es la que muestra el desarrollo normal del embrión somático, destacado por la secuencia de cambios morfológicos: globular, acorazonado y torpedo, sin embargo es posible observar otras formas complementarias como la de torpedo tardío, cotiledonar y torpedo expandido como ocurre en la embriogénesis somática del camote (Chée y Cantliffe, 1989; Delgado 1995).

Los tratamientos T₈; T₉; T₁₀; T₁₁; T₁₂; T₄; T₅; T₇; T₆; T₃; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo cual los segmentos foliares en la región media no responden a elevadas concentraciones de Acido naftalenacético y TDZ por que activan a las células y segregan sustancias lo cual terminan fenolizando a los segmentos foliares de la región media, asimismo (Taiz y Zeiger, 2004), menciona que las auxinas tienen movimiento del ápice hacia la parte basal y las citoquininas de la base hacia la parte apical,

6.3.3. Región Apical

El análisis de varianza (**Cuadro 07**), para el número de embrioides obtenidos en los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₉, T₁₀, T₁₁ y T₁₂), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B), Se obtuvo una media de 0,14

embrioides; con un coeficiente de variabilidad de 84,35% y un coeficiente de determinación de 94,00% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (Calzada, 1982).

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal sobre las concentraciones del Acido naftalenacético (A) (**Gráfico 19**), muestra que existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA demostrándose que los tratamientos libres de ANA, obtuvo la mejor respuesta con 0,33 embrioides, seguido por aquellos tratamientos que fueron tratados con 0,10 mg/l ANA que lograron obtener 0,08 embrioides, no destacándose la presencia de embrioides en aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 1,00 mg/l ANA, la respuesta a la formación de embrioides en la región apical no dependen de auxinas ya que en el ápice se movilizan mínimas concentraciones de auxinas (Taiz y Zeiger, 2004). (**Gráfico 20**), tal es el caso que para el efecto principal dosis de thidiazurón (B) las respuestas son favorables con una dosis mínima de citoquinina (0,10 mg/l) con 0,44 embrioides, destacándose la presencia de embrioides en aquellos tratamientos que exenten citoquinina con 0,00 mg/l TDZ que lograron obtener 0,11 embrioides, y su incremento disminuye progresivamente la oportunidad para generar embrioides. Tal como sucede en los demás tratamientos que no obtienen formación de embrioides, la presencia de una auxina, resultaba crítica para la iniciación de la embriogénesis y la baja concentración de auxina o su total ausencia favorecerá la maduración de los embrioides (Halperin, 1966)

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de embrioides (**Gráfico 21**), demuestra que el tratamiento (T₂) exento de auxina y mínimas concentraciones de citoquininas obtiene una mejor respuesta en el origen de embrioides con un total 1,33 embrioides en la región apical, seguido del tratamiento T₅ (0,10 mg/l ANA y 0,00 mg/l TDZ), con promedio de 0,33 embrioides, el tratamiento exento de fitohormonas y los tratamientos que fueron enriquecidos con mínimas concentraciones de fitohormonas no lograron formar embrioides; por otra parte esto se debe a que el explante carece en su interior de citoquinina.

Los tratamientos T₁₀; T₈; T₁₁; T₁; T₁₂; T₄; T₇; T₃; T₉; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo cual los segmentos foliares en la región apical no responden a elevadas concentraciones de Acido naftalenacético y TDZ por que aceleran la fenolización y/o inhiben el proceso fisiológico del explante (**Hurtado y Merino, 1994**), menciona que los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas, los cuales son producidos en una parte de ella y transferidos a otras, en la cual influyen un proceso específico.

6.4. NÚMERO DE PLÁNTULAS OBTENIDAS POR EXPLANTE

6.4.1. Región Basal

El análisis de varianza (**cuadro 08**), para el número de plántulas regeneradas obtenidos en los tratamientos (T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 , T_7 , T_8 , T_9 , T_{10} , T_{11} y T_{12}), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B), aceptándose por tanto que el desarrollo de plántulas en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., dependen, entre otras condiciones, del tipo de explante y la dosis de ANA y TDZ aplicado. Se obtuvo una media de 0,86 plántulas regeneradas; con un coeficiente de variabilidad de 35,00% y un coeficiente de determinación de 97,00% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (**Calzada, 1982**), el incremento de niveles de coeficiente de variabilidad se debe a las diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B).

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal sobre las concentraciones del Acido naftalenacético (A) (**Gráfico 22**), muestra que existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA demostrándose que los tratamientos a mínimas concentraciones de ANA, obtuvo la mejor respuesta con 1,92 plántulas regeneradas, los siguientes tratamientos estuvieron exento de la auxina con 0,00 mg/l ANA obteniendo 0,67 plántulas regeneradas, no destacándose la regeneración de plántulas en aquellos tratamientos que fueron

enriquecidos con 1,00 mg/l ANA, la respuesta de los segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., de la región Basal, responden favorablemente en ausencia de ácido naftalenacético y thidiazurón (**Gráfico 23**), tal es el caso que para el efecto principal dosis de thidiazurón (B) las respuestas son favorables con una dosis mínima de citoquinina (0,10 mg/l) con 2,00 plántulas regeneradas, destacándose la presencia que aquellos tratamientos que exenten citoquinina con 0,00 mg/l TDZ obtuvo 1,44 plántulas regeneradas, y su incremento disminuyó progresivamente la oportunidad para generar plántulas regeneradas. Tal como sucede en los demás tratamientos que no obtienen formación de plántulas regeneradas, la interacción auxina (ANA) y citoquinina (TDZ) en mínimas concentraciones inducen a la regeneración de plántulas (**Chen y Chang, 2006**), manifiesta que a altas concentraciones de citoquininas (TDZ), logró obtener plantas regeneradas después de seis meses.

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de plántulas regeneradas (**Gráfico 24**), demuestra que el tratamiento (T₅) exento de citoquinina y mínimas concentraciones de auxina obtiene una mejor respuesta con un total de 4,33 plántulas en la región basal, seguido de los tratamientos (T₆ y T₂), con promedio de 3,33 y 2,67 plántulas en la región basal, los tratamientos que fueron enriquecidos con mínimas concentraciones de fitohormonas no respondieron; por otra parte vista los efectos principales y la interacción, la regeneración de plántulas en segmentos de la región

Basal de *phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., según (Chen y Chang, 2006) a elevadas concentraciones de citoquinina logró obtener plántulas regeneradas, por lo tanto según la investigación se detalla que la interacción auxina-citoquinina muestra que a mínimas concentraciones se logró obtener plántulas regeneradas.

Los tratamientos T₁₀; T₈; T₁₁; T₁; T₁₂; T₄; T₇; T₃; T₉; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo cual los segmentos foliares en la región basal no responden a elevadas concentraciones de Acido naftalenacético y TDZ por que aceleran la fenólización y/o inhiben el proceso fisiológico del explante.

6.4.2. Región Media

El análisis de varianza (Cuadro 09), para el número de plántulas regeneradas obtenidos en los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈, T₉, T₁₀, T₁₁ y T₁₂), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B), aceptándose por tanto que el desarrollo de plántulas regeneradas en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., dependen, entre otras condiciones, del tipo de explante y la dosis de ANA y TDZ aplicado. Se obtuvo una media de 0,64 plántulas regeneradas; con un coeficiente de variabilidad de 41,74% y un coeficiente de determinación de 98,00% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (Calzada, 1982).

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal sobre las concentraciones del Ácido naftalenacético (A) (**Gráfico 25**), muestra que existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA demostrándose que los tratamientos exento de ANA, obtuvieron la mejor respuesta con 1,92 plántulas regeneradas, los siguientes tratamientos que contenían dosis diferentes de ANA no lograron destacarse en la regeneración de plántulas, la respuesta morfogénica presente en segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., de la región media, responden favorablemente en ausencia de ácido naftalenacético y thidiazurón (**Gráfico 26**), tal es el caso que para el efecto principal dosis de thidiazurón (B) las respuestas son favorables libres de citoquinina (0,00 mg/l) con 1,56 plántulas regeneradas, destacándose la presencia en aquellos tratamientos que contengan concentraciones mínimas de citoquinina con 0,10 mg/l TDZ que logró obtener 1,00 plántulas regeneradas, y su incremento disminuye progresivamente la oportunidad para generar plántulas regeneradas. Tal como sucede en los demás tratamientos que no obtienen formación de plántulas regeneradas, la interacción auxina (ANA) y citoquinina (TDZ) en mínimas concentraciones inducen a la regeneración de plántulas (**Chen y Chang, 2006**)

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de plántulas regeneradas (**Gráfico 27**), demuestra que el tratamiento (T_1) exento de auxina y citoquinina obtuvo una mejor respuesta con un total 4,67 plántulas en la

región media, seguido de los tratamientos (T₂), con promedio de 3,00 plántulas en la región media, los tratamientos que fueron enriquecidos con mínimas concentraciones de fitohormonas; por otra parte vista la eventualidad de los efectos principales y de la interacción, la regeneración de plántulas en segmentos de la región medial de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., según (Chen y Chang, 2006) a elevadas concentraciones de citoquinina logran obtener plántulas regeneradas a partir de hojas enteras, por lo tanto según la investigación se detalla que la interacción auxina-citoquinina muestra que a mínimas concentraciones se logra obtener plántulas regeneradas en la región media.

Los tratamientos T₄; T₉; T₁₀; T₁₁; T₇; T₃; T₅; T₆; T₈; T₁₂; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo cual los segmentos foliares en la región media no responden a elevadas concentraciones de Acido naftalenacético y TDZ por que aceleran la fenolización y/o inhiben el proceso fisiológico del explante (Taiz y Zeiger, 2004), menciona que las auxinas-citoquininas son reguladores de crecimiento derivados de compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

6.4.3. Región Apical

El análisis de varianza (Cuadro 10), para el número de plántulas regeneradas obtenido en los tratamientos (T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆, T₇, T₈,

T₉, T₁₀, T₁₁ y T₁₂), indica que estadísticamente existen diferencias altamente significativas, para diferentes concentraciones de ANA (A) y TDZ (B) y la interacción de ambos factores (A x B). Se obtuvo una media de 0,03 plántulas regeneradas; con un coeficiente de variabilidad de 79,37% demostrando que la amplitud de dosis utilizada entre los tratamientos fueron muy sensibles a cambios fisiológicos, para futuras investigaciones trabajar con intervalos menores de dosis hormonales y un coeficiente de determinación de 96,00% resultados que están dentro del rango de dispersión aceptable según (Calzada, 1982).

La prueba de Duncan ($p < 0,01$), para el efecto principal sobre las concentraciones del Ácido naftalenacético (A) (**Gráfico 28**), muestra que existe diferencias estadísticas significativas a nivel de la dosis de ANA demostrándose que los tratamientos a mínimas concentraciones de ANA, obtuvo la mejor respuesta con 0,08 plántulas regeneradas, los siguientes tratamientos estuvieron exento de la auxina con 0,00 mg/l ANA sin regeneración de plántulas, no destacándose la regeneración de plántulas en aquellos tratamientos que fueron enriquecidos con 1,00 mg/l ANA, la respuesta de los segmentos foliares de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., de la región apical, responden favorablemente en ausencia de ácido naftalenacético y thidiazurón. (**Gráfico 29**), tal es el caso que para el efecto principal dosis de thidiazurón (B) las respuestas son favorables pero exento citoquinina (0,00 mg/l) con 0,11 plántulas regeneradas, su incremento disminuye progresivamente la oportunidad para generar plántulas regeneradas. Tal como sucede en los demás

tratamientos que no obtienen formación de plántulas regeneradas, la interacción auxina (ANA) y citoquinina (TDZ) en mínimas concentraciones inducen a la regeneración de plántulas (**Chen y Chang, 2006**).

La interacción de los factores puestos en estudio Factor (A= auxina) x Factor (B=citoquinina), para la evaluación de plántulas regeneradas (**Gráfico 30**), demuestra que el tratamiento (T₅) exento de citoquinina y mínimas concentraciones de auxina obtuvo una mejor respuesta con un total 0,33 plántulas en la región apical, el tratamiento exento de auxina - citoquinina y los tratamientos que fueron enriquecidos con mínimas concentraciones de auxinas y citoquininas no lograron formar plantas; según (**Chen y Chang, 2006**), a elevadas concentraciones de citoquinina logran obtener plántulas regeneradas, por lo tanto según la investigación se detalla que la interacción auxina-citoquinina muestra que a mínimas concentraciones se logra obtener plántulas regeneradas.

Los tratamientos T₉; T₁₀; T₁₁; T₇; T₆; T₂; T₁; T₁₂; T₄; T₈; T₃; con respecto a esta variable no obtuvieron resultados. Por lo cual los segmentos foliares en la región apical responden a mínimas concentraciones de Acido naftalenacético pero exento de thidiazurón (**Taiz y Zeiger, 2004**), menciona que las auxinas-citoquininas son reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

6.5. CARACTERIZACIÓN DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS EN *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.

El desarrollo de la embriogénesis somática en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., obtiene una respuesta muy favorable y rápida, observándose durante todo el proceso de embriogénesis somática directa estadios embrionarios certeros, empezando por la aparición de un callo embriogénico (Ce) a los 40 días de inducción, asimismo la continuidad del proceso también muestra un estadio globular (G), estadio corazón (Co), estadio torpedo (To), estadio cotiledonar (Ct) en un tiempo de 90 días y finalmente la transformación de plantas completas hasta los 160 días de inducción. Estos cambios morfogénéticos son muy similares a los observados por (Chen y Chang, 2006); (Chanatásig, 2004).

VII. CONCLUSIONES

- 7.1. Se ha logrado determinar una metodología para la inducción de la embriogénesis somática directa de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., a partir de segmentos foliares.
- 7.2. Para los estadios pro-embrionarios de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., se logró un total de 22,67 pro-embrioides, en el cual los tratamientos exentos de dosis hormonales lograron un sub-total de 21,34 pro-embrioides: correspondiente al segmento foliar de la región basal del tratamiento ($T_1=0,00$ mg/l ANA y 0,00 mg/l TDZ) que logró formar 12,67 pro-embrioides, del mismo modo el tratamiento ($T_1=0,00$ mg/l ANA y 0,00 mg/l TDZ) del segmento foliar de la región media logró formar 8,67 pro-embrioides, sin embargo el sub-total de la interacción del tratamiento ($T_2=0,00$ mg/l de ANA y 0,10 mg/l TDZ) logró formar 1,33 pro-embrioides en la región apical.
- 7.3. Para los estadios embrionarios de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., se logró un total de 21,00 embrioides, donde los tratamientos exentos de dosis hormonales lograron un sub-total de 19,67 embrioides: correspondiente al segmento foliar de la región basal del tratamiento ($T_1=0,00$ mg/l ANA y 0,00 mg/l TDZ) que logró formar 11,00 embrioides, del mismo modo el tratamiento ($T_1=0,00$ mg/l ANA y 0,00 mg/l TDZ) del segmento foliar de la región media logró formar 8,67 embrioides, sin embargo el sub-total de la interacción del tratamiento ($T_2=0,00$ mg/l de ANA y 0,10 mg/l TDZ) logró formar 1,33 embrioides en la región apical.

- 7.4. Para la regeneración de plantas en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., se logró un total de 9,33 plantas regeneradas, donde el tratamiento exento de dosis hormonal logró un sub-total de 4,67 plantas regeneradas correspondiente al segmento foliar de la región media del tratamiento ($T_1=0,00$ mg/l ANA y $0,00$ mg/l TDZ), sin embargo el sub-total de la interacción del tratamiento ($T_5=0,10$ mg/l ANA y $0,00$ mg/l TDZ) del segmento foliar de la región basal logró formar 4,33 plantas regeneradas, asimismo la interacción de los segmentos foliares de la región apical del tratamiento ($T_5=0,10$ mg/l de ANA y $0,00$ mg/l TDZ) logró formar 0,33 plantas regeneradas.
- 7.5. Durante los procesos de la embriogénesis somática directa en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., se obtuvo callos embriogénicos a los 30 días, continuando con el estadio globular a los 45 días, prosiguiendo con el estadio corazón, estadio torpedo, culminando con el estadio cotiledonal a los 90 días y la regeneración de plantas a los 160 días.
- 7.6. En conclusión el tratamiento ($T_1=0,00$ mg/l ANA y $0,00$ mg/l TDZ) fue el que mejor respuesta obtuvo en la regeneración de plantas de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., con un promedio de 4,33 plantulas.

VIII. RECOMENDACIONES

- 8.1.** Con los resultados obtenidos realizar estudios en la inducción de embriogénesis somática directa en plantas provenientes de varas florales.
- 8.2.** Realizar estudios para la optimización de la multiplicación clonal en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., mediante embriogénesis somática indirecta y/o sistemas de inmersión temporal.

IX. RESUMEN

Con el propósito de desarrollar una metodología adecuada para la inducción de la embriogénesis somática directa en *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., a partir de segmentos foliares, se emplearon explantes de hojas inmaduras de 15 mm, obtenidas de frascos que fueron sembradas de cápsulas dehiscentes. Se evaluaron los segmentos foliares a la inducción de callos, utilizando 12 tratamientos con diferentes concentraciones de auxina-citoquinina, ácido naftalenacético (0,00; 0,10 y 1,00 mg/ℓ) y thidiazurón (0,00; 0,10; 1,00 y 3,00 mg/ℓ), acompañado de un medio de cultivo base constituido por los compuestos minerales (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 10,00 mg/ℓ Myo-inositol, 0,50 mg/ℓ Pyridoxine, 0,10 mg/ℓ Thiamine, 2,0 mg/ℓ Glycine, 170,00 mg/ℓ NaH₂PO₄, 2,0 g/ℓ Peptona, 20,00 g/ℓ de sucrosa, 3,75 g/ℓ de Agar - Agar. Prosiguiendo con el proceso de inducción del callo los explantes fueron incubados en oscuridad, cultivados en un medio de cultivo por un lapso de 30-45 días en condiciones de oscuridad y luego sometidos a luz. El porcentaje de inducción de callos evaluado en todos los tratamientos del ensayo demuestra que a los 30 días de inducción existe un 100% de reactividad callogénica, la aparición de estadios globulares pro-embrionarios de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., se manifestaron en los tratamientos T₁, T₂, T₅ y T₆, y la conformación del primer estadio embrionario (estadio globular) se manifestó en el tratamiento T₅ y T₆, posteriormente formaron plantas. Cabe mencionar que durante el desarrollo del proceso de embriogénesis somática directa se identificaron callos embrionarios de consistencia cremosa.

Palabras Claves: *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., ácido naftalenacético, thidiazurón, explante.

X. SUMMARY

With the objective of developing an appropriate methodology for induction of direct somatic embryogenesis in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., from leaf segments were used immature leaf explants of 15 mm., obtained from flasks that were seeded dehiscent capsule. Leaf segments were evaluated for callus induction, using 12 treatments with different concentrations of auxin-cytokinin, naphthaleneacetic acid (0.00, 0.10 and 1.00 mg/l) and thidiazurón (0.00, 0.10; 1.00 and 3.00 mg/l), accompanied by a basic culture medium consisting of mineral compounds (Murashige y Skoog, 1962) supplemented with 10.00 mg/l Myo-inositol, 0.50 mg/l Pyridoxine, 0.10 mg/l Thiamine, 2.0 mg/l Glycine, 170.00 mg/l NaH₂PO₄, 2.0 g/l peptone, 20.00 g/l sucrose, 3.75 g/l Agar - Agar. Continuing with the process of induction of callus explants were incubated in darkness, grown in a culture medium for a period of 30-45 days in dark conditions and then subject to light, The percentage of callus induction in all treatments evaluated shows that at 30 days of induction there is a 100% reactivity callogénica, the appearance of globular pro-embryonic stages of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., demonstrated in treatments T₁, T₂, T₅ y T₆, and the confirmation the first embryonic stage (globular stage) show in treatments T₅ y T₆, subsequently formed plants. Moreover include that during the development of direct somatic embryogenesis were identified embryonic creamy calli.

key words: *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl., naphthaleneacetic acid, thidiazuron, explant.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. **Ammirato, P.V. 1983.** Embryogenesis en: Handbook of Plant Cell Culture. W.R. Sharp, D.A. Evans, P.V. Ammirato & Y. Yamada (eds). Vol. I. Macmillan Publishing Co. New York. 83-123 pp.
2. **Blume, L.C. 1825** como autoridad en la descripción y clasificación científica de los vegetales, http://es.wikipedia.org/wiki/Phalaenopsis_amabilis.
3. **Calzada, B. 1982.** Métodos Estadísticos para la Investigación. Editorial Milagros S.A. Lima-Perú. 644 p.
4. **Chanatásig, I. 2004.** Inducción de la Embriogénesis Somática en Clones Superiores de Cacao (*Theobroma cacao* L.), con Resistencia a Enfermedades Fungosas. M.Sc. Tesis. CATIE. Turrialba - Costa Rica. 33-65 p.
5. **Chée, R.P. y Cantliffe, D.J. 1988.** Somatic Embryony Patterns and Plant Regeneration in *Ipomoea batatas* Poir. In Vitro Cell Dev. Biol 24: 955-958 pp.
6. **Chée, R.P. y Cantliffe, D.J. 1989.** Composition of Embryogenic Suspensión Cultures of *Ipomoea batatas* Poir. And Production of Individualized Embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 23: 923-925 pp.

7. **Chen, J.T. y Chang, W.C. 2006.** Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis amabilis* – *Biologia Plantarum* 50 (2): 169 - 173.
8. **Delgado, G.E. 1995.** Cultura de Tecidos de Batata (*Ipomoea batatas* (L) Lam.): Propagacao, Morphogenese e Veriacao Somaclonal. Ph.D. Tese. IB/USP. 166 p.
9. **Delgado, G. y Rojas C. 1999.** Cultivo de Tejidos Vegetales. Fundamentos y Aplicaciones. Universidad Pedro Ruíz Gallo. Lambayeque-Perú. 166-191, 221-254 p.
10. **Ernst, R. 1994.** Effects of thidiazurón on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 39:273–275.
11. **Escalant, J.V. y Teisson, C. 1989.** Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Report* 7: 665-668.
12. **Evans, D.A.; Sharp, W.R. y Flick, C.E. 1981.** Growth and Behaviour of Cell Cultures: Embryogenesis and Organogenesis en: *Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. T.A. Thorpe (e.d). Academic Press. New York. 45-113 pp.

13. **Fontana, M.; Vidoz M.; Rey, H.Y. y Mroginski, L. 2006.** Resumen A-006.
Regeneración de Plantas por Cultivo in Vitro de *Arachis villosa*
(Leguminosae). 1-2 p.
14. **George, E.F. y Sherrington, P.D. 1984.** Plant Propagation by Tissue
Culture. Part. 1. The Technology. Exegetics Ltd. 709 pp.
15. **Gil, J.Y. 1987.** The propagation of *Phalaenopsis*. Part II. Malay Orchid Rev.
(Singapur) 21: 45-46
16. **Guha, S. y Maheshwari, S.C. 1964.** In Vitro Production of Embryos from
Anthers of *Datura*. Nature 204:497.
17. **Gómez, R. 1998.** Generalidades sobre la embriogénesis somática.
Resúmenes del curso Internacional de Propagación Masiva in Vitro de
Especies vegetales Instituto Biotecnología de las Plantas. Santa Clara –
Cuba. 134 p.
18. **Gonzales y Raciman. 2003.** “Fitorreguladores de Crecimiento”. Consultado
el 21 de Marzo del 2008. Disponible en :
[http://persowanadoo.es/pedrogruen/hormonasvegetalesyreguladores.ht](http://persowanadoo.es/pedrogruen/hormonasvegetalesyreguladores.htm)
m
19. **Guerrero, J. 2007.** Tesis. Inducción de la Embriogénesis Somática en Sacha
Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) a partir de hojas inmaduras. Edit. UNSM-
FCA. 1-90 p.

20. **Hacius, B.** 1978. Question of Unicellular Origin of Non-zygotie Embryos in Callus Cultures. *Phytomorphology* 28:74-81 pp.
21. **Halperin, W. y Wetherell, D.F.** 1965. Ammonium Requeriment for Embryogenesis in vitro. *Nature* 205:519-520 pp.
22. **Halperin, W.** 1966. Alternative Morphogenic Ebents in Cell Suspensions. *AMER. J. Bot.* 53:443-453 pp.
23. **Handro, W.; Roa, P.S. y Harada, H.** 1973. A histological Study of the Depelopment of Buds, roots, and Embryos in Organ Cultures of *Petunia inflata* R. Fries. *Ann. Bot.* 37:817-821 pp.
24. **Harper, T.** 2004. "*Phalaenopsis* Culture: Advice for Growing 20 Species." *Orchids Magazine*, Volume 73, No. 2 (February 2004). Delray Beach, FL: American Orchid Society, 2004.
25. **Haissig, E.B.** 1974. Origin of adventitious roots. *New Zealand Journal of Forestry Science* (Nueva Zelanda) 4 (2): 299-310.
26. **Hurtado y Merino.** 1994. "Cultivo de Tejidos Vegetales". 3ra Edición. Ed. Trillas S.A. México, pp. 45- 160.
27. **Jones, L.H.** 1974. Long-term Survival of Embryoids of Carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Sci. Lett.* 2:221-224 pp.

28. Lindsey, K. y Topping, J.F. 1993. Embryogenesis: a Question of Pattern. J. Exp.Bot. 259: 359-374 pp.
29. Linz, R.E. y Conover, R.A. 1991. In Vitro Polyembryony in *Carica papaya* L. ovules. Z. Pflanzenphysiol. 104:185-188 pp.
30. Lu, C. y Vasil, I.K. 1981. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Tissues of *Panicum maximum* Jacq. Theor. Appl. Genet. 59:275-280 pp.
31. Maglietti, A. y Hebe Y. 2006. Resumen A-028. Organogénesis in vitro a partir de explantes de hoja de *Arachis burkartii*. 1-4 pp.
32. Mroginski, E.; Rey, H.Y. y Mroginski, L. 2006. Resumen A-036. Obtención de Plantas a Partir del Cultivo *in vitro* de Explantes Foliares de *Arachis correntina* (Leguminosae). 1-4 pp.
33. Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497
34. Nitsch, J.P. 1969. Experimental Androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology 19: 389-404 pp.
35. Raghavan, V. 1976. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. Academic Press. New Cork. 12: 23-50 pp.

36. **Roca, W y Mroginski, L.** 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. 499 - 553 -554 p.
37. **Reinert, J.** 1958. Morphogenese und Ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwissenschaften* 45: 344-345 pp.
38. **Reinert, J.** 1959. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Advientive Embryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 58:318-333 pp.
39. **Salisbury, F. y Ross, W.** 2000. Fisiología de las plantas. Ed. Paraninfo. Madrid, España. 988 p.
40. **Sannasgala K.** 1989 In vitro somatic embryogenesis in *Musa* spp. Thesis Ph.D. K.U. Leuven, Belgium. 172p.
41. **Schiavione, G. y Cooke, R.** 1985. Genotypic Effects on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of alfalfa. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8:73-81 pp.
42. **Sharp, W.R.; Sondahl, M.R.; Caldas, L.S. y Maraffa, S.B.** 1980. The Physiology of in Vitro Asexual Embryogenesis. *Hortic. Rev.* 2: 268-310 pp.
43. **Skoog, F. y Miller, C.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-130.

44. **Sommer, H.E.; Brown, C.L. y Kormanik, P.P. 1975.** Differentiation of Plantlets in Long-Leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) Tissue Cultured In Vitro. Bot. Gaz. 136:196-200 pp.
45. **Steward, F.C.; Mapes, M.O. y Smith, J. 1958.** Growth and Organized Development of Cultured Calls. I. Growth and Division of Freely Suspended Cells. Amer. J. Bot. 45:705-708 pp.
46. **Steeves, T.A. y Sussex, I.M. 1989.** Patterns in Plant Development. 2da ed. Cambridge: Cambridge University Press 26-35 pp.
47. **Taiz, L. y Zeiger, E. 2004.** Fisiología Vegetal. 3^{er} edición. *Plant physiology* Pág. 517-519.
48. **Thorpe, 1981.** *Plant tissue culture*. Methods and applications in agriculture. Acad. Press. Nueva York. Pág. 1 – 379.
49. **Tisserat, B.; Esan, E. y Murashigue, T. 1979.** Somatic Embryogenesis in Angiosperms. Hort. Rev. 1: 1-78 pp.
50. **Vasil, I.K. y Hildebrandt, A.C. 1966.** Variations of Morphogenetic Behavior in Plant Tissue Cultures. II. *Pstroselinum hortense*. Am. J. Bot. 53:869-874 pp.
51. **Veitch, H.J. 1886.** The hybridization of orchids. J. Royal Hort. Soc. 7:22–49.

ANEXO

Anexo 01: Preparación de soluciones stock de sales para medio (Murashige y Skoog, 1962)

Stock	producto	concentr. De Stock	Unid.	Vol. Final Stock(ml)	Pesar	Unidad	Observaciones	
Stock A	Nitrato de amonio	82,50	g/L	250,00	20,625	g	disolver en agua destilada y enrazar a 250 ml CORROSIVO, no pesar en papel aluminio	
Stock B	Nitrato de potasio	95,00	g/L	250,00	23,750	g	Disolver en egua destilada y enrazar a 250 mL.	
Stock C	Cloruro de calcio deshidratado	88,00	g/L	200,00	17,600	g	Disolver en egua destilada y enrazar a 200 mL.	
Stock D	Fosfato de potasio monobasico	34,00	g/L	200,00	6,800	g	Disolver en egua destilada y enrazar a 200 mL.	
Stock E				200,00			Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado	
a. Na_2MoO_4 Molibdato de Sodio Dihidratado		0,0500	g/L		0,0100	g	1	Pesar 0,1g disolver en 100 ml H ₂ O
							2	Tomar 10 ml de esta solución
							3	Disolverlos en 200 ml del stock E
							4	Descartar los 90 ml restantes
b. $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Cloruro de cobalto dihidrato		0,0050	g/L		0,0010	g	1	Pesar 0,1g disolver en 100 ml H ₂ O
							2	Tomar 1 ml de esta solución
							3	Disolverlos en 200 ml del stock E
							4	Descartar los 99 ml restantes
c. H_3BO_3 Acido bórico		1,240	g/L		0,2480	g	Disolver con H ₂ O directamente en el frasco de Stock E CORROSIVO, disolver inmediatamente. PELIGROSO al contacto con la piel	
d. KI Yoduro de potasio		0,1660	g/L		0,0332	g	Disolver con H ₂ O directamente en el frasco de Stock E	
Stock F				200,00		g	Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado	

a. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Manganeso monohidratado		3,380	g/L		0,6760	g	Disolver con H_2O directamente en el frasco de Stock F	
b. $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Magnesio Heptahidrato		74,000	g/L		14,800	g	Disolver con H_2O directamente en el frasco de Stock F	
c. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Zinc Heptahidrato		1,725	g/L		0,3450	g	Disolver con H_2O directamente en el frasco de Stock F	
d. $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ Sulfato de cobre pentahidrato		0,0050	g/L		0,0010	g	1	Pesar 0,1g disolver en 100 ml H_2O
							3	Tomar 1 ml de esta solución
							3	Disolverlos en 200 ml del stock
							4	Descartar los 99 ml restantes
Stock G				250,00		g	Este es un Stock compuesto por varios reactivos en muy bajas concentraciones, por lo que primero deben prepararse por separado	
a. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ EDTA		1,865	g/L		0,4663	g	1	Disolver el EDTA en 200 ml de agua destilada, esperar 20 min.
							2	Calentar la solución hasta antes de hervir
b. $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ Sulfato ferroso Heptahidratado		1,390	g/L		0,3475	g	3	Agregara el FeSO_4 lentamente hasta obtener una solución amrilla clara
							4	Almacenar en frasco oscuro y en refrigeración (4 °C)

Anexo 02: Preparación de medio de cultivo para inducción de callogénesis

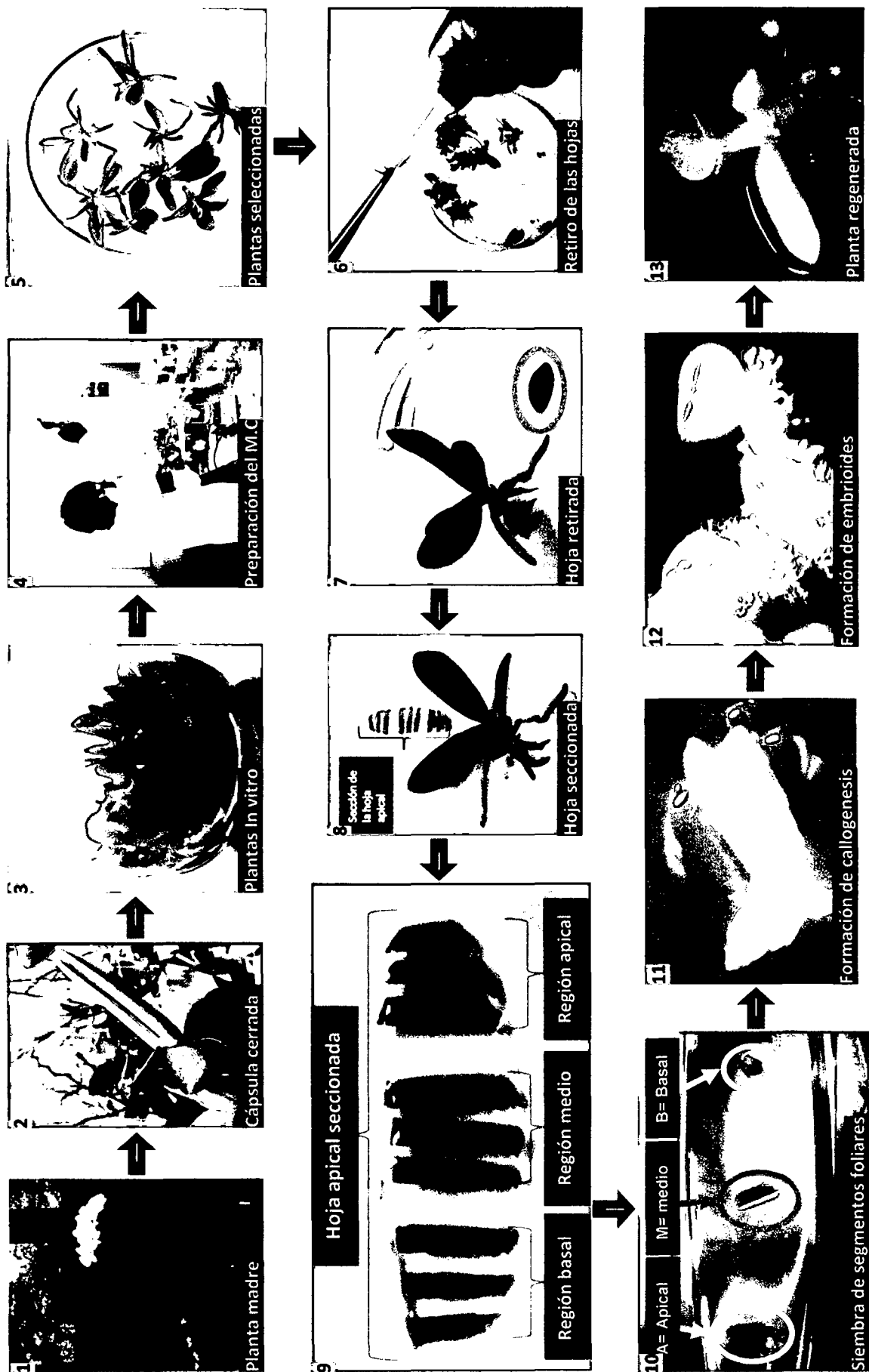
ITEM	Stock	Concentración	Volumen/l	Unidad	
Macro y micro nutrientes (Compuestos inorgánicos)					
01	Stock A		10.00	ml	
02	Stock B		10.00	ml	
03	Stock G		10.00	ml	
04	Stock C		2.50	ml	
05	Stock D		2.50	ml	
06	Stock E		2.50	ml	
07	Stock F		2.50	ml	
Vitaminas					
08	Myo - inositol	1000 ppm	10.00	mg	
09	Pyridoxine - HCL	1000 ppm	0.50	mg	
10	Thiamine - HCL	1000 ppm	0.10	mg	
11	Glycine	1000 ppm	2.00	mg	
12	Peptone	1000 ppm	1.00	g	
13	NaH ₂ PO ₄	1000 ppm	170.00	mg	
Azucares					
14	Sucrosa	2.00%	20.00	g	
Fitohormonas (Diferentes concentraciones)					
15	Ácido naftalenacético (ANA) - Factor (A)	a ₁	1000 ppm	0.000/150	mg
		a ₂	1000 ppm	0.015/150	mg
		a ₃	1000 ppm	0.150/150	mg
16	Thidiazurón (TDZ) - Factor (B)	b ₁	1000 ppm	0.000/150	ml
		b ₂	1000 ppm	0.015/150	ml
		b ₃	1000 ppm	0.150/150	ml
		b ₄	1000 ppm	0.450/150	ml
Gel solidificante					
17	Agar agar	37.50%	3.75	g	
18	pH: 5,2				

Tomado de Chen y Chang, 2006

Anexo 03: Procedimiento sugerido por (Guerrero, 2007), para el anexo N° 02

PASOS	ACTIVIDAD	ITEM (Formulación)
1	Rotular los tubos de prueba de 25x150 mm	
2	Agregar 650 mL de agua destilada	
3	Agregar sucrosa 20.0 g	14
4	Agregar Compuestos Macro-	1,2,3
5	Agregar Compuestos Micro-	4,5,6,7
6	Agregar Vitaminas:	
	Myo - inositol	8
	Pyridoxine - HCL	9
	Thiamine - HCL	10
	Glycine	11
	Peptone	12
	NaH ₂ PO ₄	13
7	Enrazar a: 1000,00 ml con agua destilada	
	Separar en: 12 partes de 145.00 ml de medio cultivo base	
8	Agregar Fitohormonas (ANA y TDZ) de acuerdo a la conjugación de los tratamientos	15,16
	Agregar: ANA las concentraciones indicadas en el cuadro N° 02	15
10	Agregar: TDZ las concentraciones indicadas en el cuadro N° 02	16
11	Enrazar a: 150.00 mL con el medio de cultivo base restante para cada tratamiento	
12	Medir: pH: 5.1 – 5.3 como rangos	18
13	Agregar: Agar agar 0.31 g por tratamientos	17
14	Esterilizar a 15 lbs por 20 minutos	
15	Dejar enfriar en cámara de incubación	

Anexo 04: Obtención de una plántula a partir de un segmento de hoja de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.



GLOSARIO

ANA	:	Ácido naftalenacético
AUXÍNA	:	Hormona vegetal que ocasiona el crecimiento de las plantas por elongación celular.
TDZ	:	Thidiazurón [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea]
CALLOGÉNESIS	:	Proceso fisiológico que da origen a la formación de callos en una forma desordenada.
CÁPSULA	:	Fruto seco, con una o más cavidades que contienen varias semillas y cuya dehiscencia se efectúan según el plano que no es perpendicular al eje del fruto.
CITOQUININA	:	Grupo de reguladores de crecimiento que induce a la formación de yemas y multiplicación celular.
CLON	:	Célula que posee carga genética idéntica a la célula madre.
DEHISCENCIA	:	Acción de abrirse naturalmente las anteras de una flor o el pericarpio de un fruto, para dar salida al polen o a la semilla.
EMBRIOGÉNESIS		
SOMÁTICA	:	Técnica de multiplicación clonal, que permite obtener embriones cigóticos sin tener que pasarse por la reproducción sexual.

- EMBRIÓIDE** : Célula de óptimo desarrollo que permite la expresión de la totipotencialidad mediante la generación de un individuo.
- EMBRIÓN** : En las plantas fanerógamas, esbozo de la futura planta, contenido en la semilla.
- ENRAZAR** : Agregar, nivelar con agua o solución.
- IN VÍTRO** : Cultivo en vidrio
- INHIBICIÓN** : Componente de los sistemas de regulación, fisiológicos, que actúan en los seres vivos.
- EXPLANTE** : Porción de tejido vegetal adquirido de cualquier parte de una planta.
- MONOPODIAL** : Tipo de crecimiento donde es siempre la yema terminal la que produce año tras año los vástagos.
- PROTOCORMO** : Estructura diferenciada formada del desarrollo de las semillas, para luego formarse una plántula en condiciones in Vitro.
- REGENERACIÓN** : Capacidad que expresan las células a la formación de nuevos individuos.
- SIMPODIAL** : Tipo de crecimiento donde la yema axilar reemplaza a la yema terminal que muere cada año.
- STOCK** : Cantidad de componentes que se tienen en una sola solución.
- TOTIPOTENCIALIDAD:** Capacidad de regeneración de una célula.